

**Étude de l'épissage alternatif du co-facteur de transcription pro-  
apoptotique TAF6 $\delta$**

par Marie-Eve Stébenne

Département de Microbiologie et d'Infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé  
En vue de l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M.Sc.) en Microbiologie

Mai 2009

Évaluateurs

Brendan Bell PhD, Département de microbiologie et d'infectiologie  
Benoît Chabot PhD, Département de microbiologie et d'infectiologie  
Roscoe Klinck PhD, Département de microbiologie et d'infectiologie  
François Bachand PhD, Département de biochimie



Library and Archives  
Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*  
ISBN: 978-0-494-61419-8  
*Our file Notre référence*  
ISBN: 978-0-494-61419-8

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

**Étude de l'épissage alternatif du co-facteur de transcription pro-apoptotique TAF6 $\delta$**

par Marie-Eve Stébenne  
Département de Microbiologie et d'Infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé  
En vue de l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M.Sc.) en Microbiologie

Mai 2009

**RÉSUMÉ**

TAF6 est un co-facteur de transcription qui fait partie du complexe multiprotéique, TFIID. TAF6 possède 4 isoformes et deux d'entre eux ont des fonctions opposées. TAF6 $\alpha$  est l'isoforme anti-apoptotique et peut dimériser avec TAF9, tandis que TAF6 $\delta$  est l'isoforme pro-apoptotique et ne peut pas dimériser avec

TAF9. TAF6 $\delta$  induit l'apoptose indépendamment de p53. Cette nouvelle voie apoptotique présente un intérêt certain et l'étude de la régulation de l'épissage alternatif de TAF6 $\delta$  est essentielle pour comprendre le mécanisme par lequel TAF6 $\delta$  induit l'apoptose. Nous avons donc développé un minigène de TAF6 qui récapitule le patron d'épissage endogène. Nous avons muté le minigène TAF6 afin d'identifier des éléments sur l'ARN contrôlant son épissage. Ces éléments ont été retrouvés surtout au niveau de l'exon 2 et de l'intron entre l'exon 2 et l'exon 3. Trois sites activateurs d'épissage ont été déterminés dans l'exon 2. De plus, nous avons démontré la présence d'une structure secondaire importante dans le choix du site 5' d'épissage. Nous avons aussi établi que la distance de 30 nucléotides entre les deux sites 5' d'épissage avait un rôle à jouer dans le choix de ce site d'épissage. Un dernier site activateur a été positionné dans l'intron. D'après ces résultats de mutations et un criblage PCR d'ADNc de cellules transfectées par des siRNAs contre des protéines de liaison à l'ARN, nous avons identifié hnRNP K comme facteur *trans* potentiel régulant l'épissage de TAF6. Les facteurs *trans* liants les éléments *cis* permettent de réguler en partie l'épissage alternatif d'un ARN pré-messager. Des expériences d'immunoprécipitation *in vivo* nous ont permis d'établir qu'il existe une interaction entre l'ARN de TAF6 et hnRNP K. Le signal extracellulaire qui agit sur les éléments *cis* et permet de changer l'épissage alternatif de TAF6 est encore inconnu. Nous avons tenté de le déterminer, mais, pour l'instant, nos hypothèses n'ont pas été confirmées par les expériences menées. L'apoptose, si elle est dérégulée, peut mener à des pathologies. L'expression de TAF6 et l'inclusion d'éléments répétitifs *Alus* dans son ARN messager ont été démontrés comme étant augmentées dans les cellules



tumorales du sein. Nous avons aussi commencé l'étude de l'importance de ces éléments répétitifs dans l'augmentation de l'expression de TAF6 dans les cancers. Nous avons identifié une mutation ponctuelle au niveau de la deuxième séquence répétitive *Alu* qui peut être retrouvée dans TAF6, mais nous ne connaissons pas encore sa fonction dans la surexpression de TAF6 dans les cancers du sein. Bref, ce mémoire présente les différents résultats obtenus dans le cadre d'expériences dont le but était d'identifier les éléments *cis*, les facteurs *trans*, le signal déclenchant l'épissage et le rôle des éléments répétitifs *Alus* présents dans l'ARN de TAF6.

Mots-clés : épissage alternatif, TAF6delta, apoptose, TFIID, *Alu*.

# **TABLE DES MATIÈRES**

<b>TABLES DES MATIÈRES</b>	<b>II</b>
<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS (FIGURES ET TABLEAUX)</b>	<b>VI</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b>	<b>VIII</b>
<b>RÉSUMÉ</b>	
<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<i>Apoptose</i>	<i>1</i>
<i>Initiation de la transcription</i>	<i>7</i>
<i>TFIID</i>	<i>10</i>
<i>TAF6<math>\delta</math></i>	<i>14</i>
<i>Épissage et épissage alternatif</i>	<i>17</i>
<i>Éléments répétitifs Alus</i>	<i>22</i>
<b>OBJECTIFS SPÉCIFIQUES</b>	<b>25</b>
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>	<b>27</b>
Lignées cellulaires	27
Liste des oligonucléotides	27

<b><i>Éléments cis</i></b>	<b>29</b>
Obtention du minigène	29
Transformation dans des bactéries chimio-compétentes	30
Mini-préparation d'ADN plasmidique	30
Transfert du fragment TAF6 dans le plasmide pcDNA3.1+	31
Mutagenèse par PCR du minigène TAF6	32
Transfection des HeLa ws par pcDNA3.1+ TAF6 ou ses mutants	33
Extraction d'ARN	33
Rétrotranscription (RT)	34
Réaction en chaîne par polymérase (PCR) radioactive et non-radioactive	35
Gel 15% non-dénaturant	35
Quantification des PCRs	36
<b><i>Facteurs trans</i></b>	<b>36</b>
Amplification par PCR des échantillons d'ADNc du groupe Génome	36
Transfection d'un siRNA contre hnRNP K dans les cellules PC3	37
Extraction de protéines pour immunobuvardage de type Western	37
Immunobuvardage de type Western pour hnRNP K	38
Transcrit d'ARN radiomarqué du minigène	39
Pontage aux ultraviolets (UV crosslinking)	40
Immunoprécipitation couplée au pontage aux UVs	41
Immunoprécipitation <i>in vivo</i>	42
Immunoprécipitation <i>in vivo</i> avec pontage au formaldéhyde (ChIP ARN)	44
<b><i>Signal d'épissage</i></b>	<b>46</b>

<i>Éléments répétitifs Alus</i>	50
Extraction d'ADN génomique des HeLa ws	50
PCR sur BAC pour TAF6 de 5,4kb	51
Ligation de TAF6 5,4kb dans le vecteur de transfert, pCR-XL-TOPO	52
Récupération de l'insert TAF6 5,4kb et insertion dans pcDNA3.1+	52
PCR pour les éléments répétitifs <i>Alus</i>	53
<b>RÉSULTATS</b>	<b>54</b>
<i>Éléments cis</i>	54
<i>Facteurs trans</i>	70
<i>Signal d'épissage</i>	83
<i>Éléments répétitifs Alus</i>	87
<b>DISCUSSION ET CONCLUSION</b>	<b>90</b>
<i>Éléments cis</i>	90
<i>Facteurs trans</i>	92
<i>Signal d'épissage</i>	95
<i>Éléments répétitifs Alus</i>	96
<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>101</b>
<b>RÉFÉRENCES</b>	<b>102</b>

<b>ANNEXES</b>	<b>116</b>
Annexe 1.	116
Annexe 2.	119
Annexe 3.	119
Annexe 4.	123

## **LISTE DES ILLUSTRATIONS (FIGURES ET TABLEAUX)**

<b>Figure 1.</b> Les deux voies de l'apoptose	2
<b>Figure 2.</b> La famille Bcl-2	5
<b>Figure 3.</b> Assemblage trilobaire de TFIID	10
<b>Figure 4.</b> Les 5 isoformes de TAF6	15
<b>Figure 5.</b> Mécanisme de l'épissage	18
<b>Figure 6.</b> Comparaison du TAF6 endogène et du TAF6 produit par le minigène	55
<b>Figure 7.</b> Position des mutations effectuées pour définir les éléments <i>cis</i> ARN	56
<b>Figure 8.</b> Validation du minigène TAF6 par mutations des sites d'épissage, point de branchement et de la séquence riche en pyrimidine.	57
<b>Figure 9.</b> Mutations dans la zone 1	59
<b>Figure 10.</b> Mutations dans la zone 2	60
<b>Figure 11.</b> Structure secondaire potentielle de TAF6 type sauvage et TAF6 A – G	62
<b>Figure 12.</b> Position des mutants Cko, 5'Cko, 3'Cko et ko5	64
<b>Figure 13.</b> Position des éléments importants de la deuxième zone	65
<b>Figure 14.</b> Mutations dans la zone 3	65
<b>Figure 15.</b> Mutations dans la zone 4	67
<b>Figure 16.</b> Mutations double et triple dans la séquence du minigène TAF6	68
<b>Figure 17.</b> Résumé des éléments <i>cis</i> déterminés dans la séquence du minigène de TAF6	69
<b>Figure 18.</b> Transfection du siRNA contre hnRNP K dans les cellules PC3	77
<b>Figure 19.</b> Pontage aux ultraviolets du transcrit ARN du minigène TAF6	78

<b>Figure 20.</b> Pontage aux UV suivi d'une immunoprécipitation pour hnRNP K	79
<b>Figure 21.</b> Immunoprécipitation en conditions natives et ChIP ARN	81
<b>Figure 22.</b> Immunoprécipitation <i>in vivo</i> en conditions natives	82
<b>Figure 23.</b> Clone de 5 485 paires de bases de TAF6	87
<b>Figure 24.</b> Alignement de séquence pour l' <i>Alu1</i>	88
<b>Figure 25.</b> Alignement de séquence pour l' <i>Alu2</i>	89
<b>Figure 26.</b> Modèle pour l'épissage alternatif de TAF6	97
<b>Figure 27.</b> Alignement de séquence pour TAF6	116
<b>Figure 28.</b> Site de liaison activateur déterminé par ESEFinder et associé à 3 protéines de liaison à l'ARN	119
<b>Tableau 1.</b> Liste des séquences des oligonucléotides utilisés	27
<b>Tableau 2.</b> Liste des traitements sur les cellules HeLa ws	46
<b>Tableau 3.</b> Reprise par PCR radioactive des échantillons positifs dans les 6 premières séries	71
<b>Tableau 4.</b> Résultats des ratios TAF6 $\delta$ / total d'épissage en fonction des protéines inhibées par différents siRNAs transfectés dans 5 lignées cellulaires	72
<b>Tableau 5.</b> Expériences effectuées pour l'identification du signal d'épissage de TAF6 $\delta$	83
<b>Tableau 6.</b> 6 premières séries d'ADNc de siRNAs contre différentes protéines dans 7 lignées cellulaires testées pour le changement d'épissage de TAF6	119

## **LISTE DES ABBRÉVIATIONS**

5' : extrémité 5'

3' : extrémité 3'

°C : degré Celcius

A: adénosine

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ADP : adénosine diphosphate

dADP: désoxyadénosine diphosphate

ATP : adénosine triphosphate

ATPase : adénosine triphosphatase

rATP : riboadénosine triphosphate

ARN: acide ribonucléique

ARNt : acide ribonucléique de transfert

ARNT: *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*

CaCl<sub>2</sub> : dichlorure de calcium

CoCl<sub>2</sub> : chlorure de cobalt

CH<sub>3</sub>COOH : acide acétique

CH<sub>3</sub>COOK : acétate de potassium

cm : centimètre

CO: monoxyde de carbone

CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone



CORM-2: molécule de relâche de monoxyde de carbone

cpm: coups par minute

C-terminal : carboxy-terminal

CTP : cytosine triphosphate

dCTP : désoxycytosine triphosphate

DETA/NO : 2,2'-(Hydroxynitrosohydrazono) bis-éthanimine

dinuéclotide GU : dinuéclotide guanosine-uracile

DMEM : Dubelcco's Modified Eagle's Medium

DNase A : désoxyribonucléase A

dNTPs : désoxynucléotides triphosphate

DTT: dithiothréitol

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique

FeSO<sub>4</sub> : sulfate de fer (II)

G: guanosine

µg : microgramme

ng : nanogramme

h : heure

hnRNP : heterogenous ribonucleoprotein particle

µJ: microJoules

kb: kilobase

KCl : chlorure de potassium

kDa: kilodalton

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : phosphate monobasique de potassium

LB : Luria Broth

L-NAME: N $\omega$ -Nitro-L-arginine méthyl ester hydrochloride

M : molaire

mM : millimolaire

$\mu$ M : micromolaire

mL : millilitre

$\mu$ L : microlitre

mg : milligramme

MBq : méga Bequerel

MgCl<sub>2</sub> : dichlorure de magnésium

min : minute

NaCl : chlorure de sodium

NaF : fluorure de sodium

NaOAc: acétate de sodium

NaOH : hydroxyde de sodium

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : phosphate de sodium

Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> : thiosulfate de sodium

Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> : hydrosulfite de sodium

NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O : chlorure de nickel hexahydrate

NO : oxyde nitrique

NP-40 : Nonidet P-40

N-terminal : amino-terminal

O<sub>2</sub> : dioxygène

2'OH : hydroxide à l'extrémité 2'

<sup>32</sup>P : phosphore-32

pb : paire de bases

PBS : tampon salin de phosphate

PIC: cocktail d'inhibiteurs de proteases

PMSF : fluorure de phénylméthylsulfonyl

polyA : séquence riche en adénosine

polyC : séquence riche en cytosine

protéines SR : protéines riches en Sérine/Arginine

psi : livre par pouce carré

RNase A : ribonucléase A

rNTP : ribonucléotides triphosphate

SDS : sodium dodécylsulfate

snRNP : *small nuclear ribonucleoprotein*

SVF : sérum de veau fœtal

SVNN : sérum de veau nouveau-né

TBE : tampon Tris-borate-EDTA

TGFβ: *tumor growth factor-beta*

U: unité

U: uracile

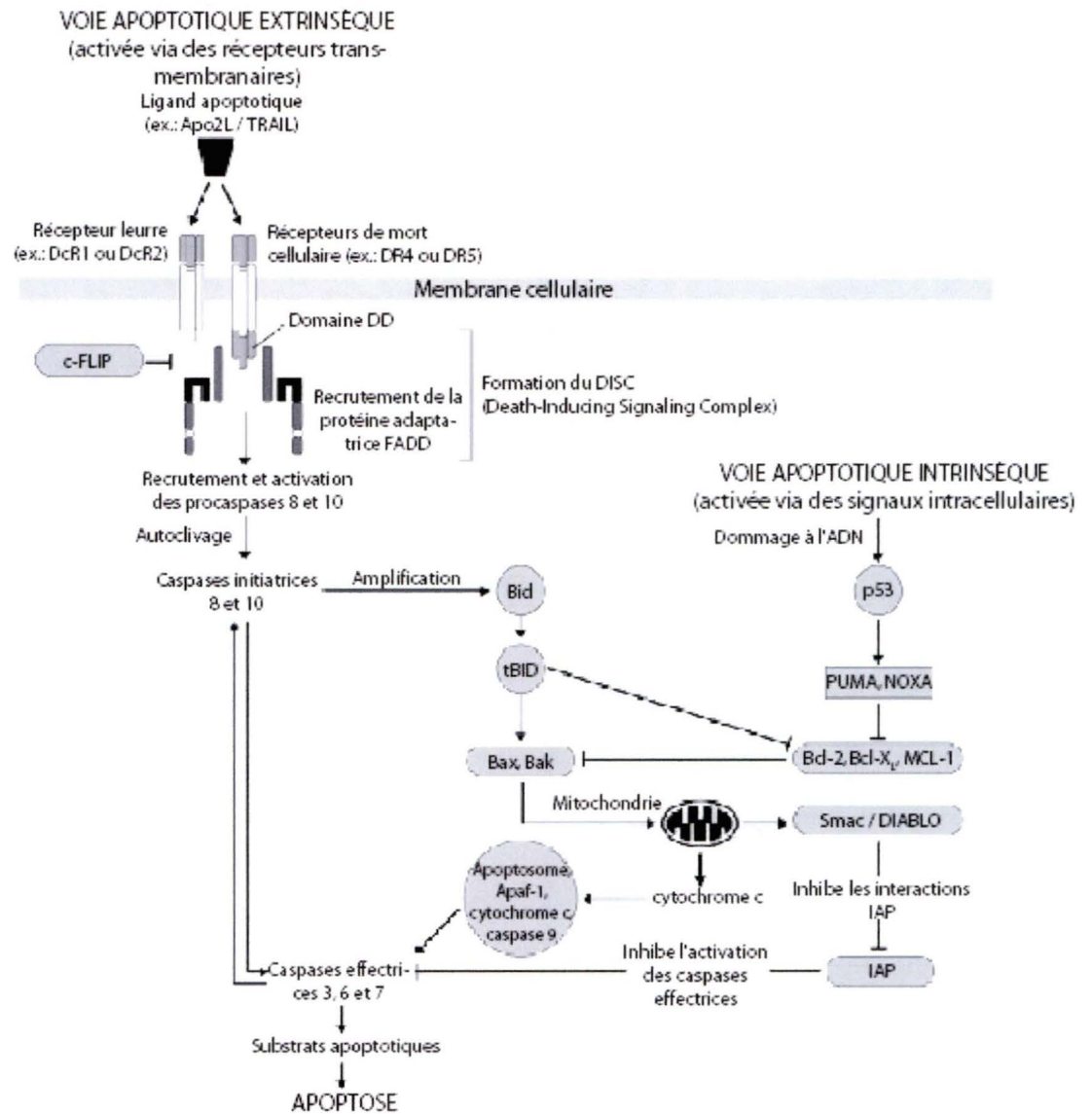
V : volt

x g : multiplicateur de la force gravitationnelle, g représente l'unité de force gravitationnelle

## **INTRODUCTION**

### ***Apoptose***

L'apoptose est un important processus biologique qui contribue au maintien de l'homéostasie de l'organisme et aide au développement de celui-ci (BLANKENBERG, F.G., 2008). Il permet d'éliminer les cellules endommagées, surnuméraires ou potentiellement dangereuses (ASHKENAZI, A., 2008). La dérégulation de la mort cellulaire programmée peut mener à des maladies, telles que le Parkinson (SINGH, S. et DIKSHIT, M., 2007), l'Alzheimer (CENINI, G. et al, 2008) ou encore le cancer (CONNELL, C.M. et al, 2008). La cellule peut entrer en apoptose par deux voies distinctes, soit la voie intrinsèque ou extrinsèque (figure 1). La voie intrinsèque est initiée par des signaux intracellulaires, tels des dommages à l'ADN et implique souvent l'activation de p53 (CHIPUK, J.E. et GREEN, D.R., 2006). La voie extrinsèque est, quant à elle, indépendante de p53 et est initiée par des signaux extracellulaires, par exemple, des cellules infectées par un virus ou tumorales peuvent entraîner un relâchement de TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) par les cellules T (KAYAGAKI, N., 1999). TRAIL pourra alors entraîner l'apoptose des cellules infectées en se liant à son récepteur de mort à la surface cellulaire (KAYAGAKI, N., 1999).



**Figure 1. Les deux voies de l'apoptose.** Les deux voies sont activées différemment et impliquent différentes protéines, voir texte pour plus de détails (adapté de ASHKENAZI, A., 2008).

La voie extrinsèque est déclenchée lorsqu'un ligand de mort cellulaire tel que TRAIL (Apo2L) se lie à son récepteur DR4 (*death receptor 4*) ou DR5 à la surface cellulaire (SHERIDAN, J.P., 1997). D'autres facteurs de mort sont aussi possibles tels que FasL (CD95L) ou encore TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor-alpha*) (SUDA, T. et NAGATA, S., 1994 et POLUNOVSKY, V.A. et al, 1994). Il peut aussi se lier à un récepteur leurre, DcR1 (*decoy receptor 1*) ou DcR2, qui ne possède pas de domaine DD (*death domain*) et, ainsi, ne peut pas entraîner l'apoptose des cellules (SHERIDAN, J.P., 1997). Les récepteurs DR4 ou DR5 possèdent des domaines intracellulaires DD qui, par des interactions protéine-protéine, vont recruter des protéines ayant des domaines DD, entre autre la protéine adaptatrice FADD (*Fas-associated via death domain*) (KISCHKEL, F.C. et al, 1995). Celle-ci possède deux domaines, soit le domaine DD qui permet l'interaction avec le récepteur et un domaine DED (*death effector domain*) qui permet de recruter les caspases (*apoptosis-related cysteine peptidase*) initiateurs, les procaspases 8 et 10, formant ainsi le DISC (*death-inducing signalling complex*) (KISCHKEL, F.C. et al, 2001). Les procaspases 8 (FLICE) et 10 résident en monomères inactifs dans le cytoplasme. Leur recrutement dans le DISC induit un effet de proximité qui mène à l'auto-clivage protéolytique des procaspases en caspases actives dimériques (MUZIO, M. et al, 1998). Par la suite, les caspases initiateurs 8 et 10 actives sont relâchées dans le cytoplasme et vont cliver les procaspases effectrices 3, 6 et 7 (STENNICKE, H.R. et al, 1998). La caspase 8 est aussi capable de cliver Bid (*BH3 interacting death domain agonist*) produisant tBid (*truncated Bid*) qui possède seulement le domaine BH3. Cela permet la perméabilisation de la membrane de la mitochondrie (LI, H. et al, 1998). Les procaspases 3 et 7 existent déjà sous forme de dimères inactifs dans le cytosol,

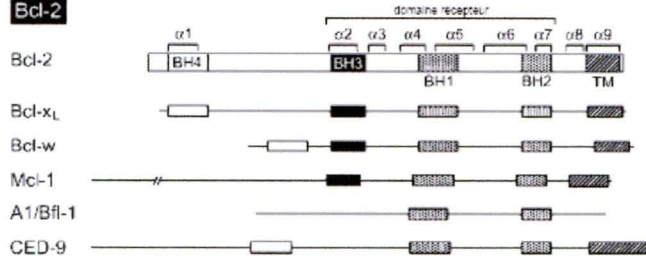
contrairement aux caspases initiatrices (BOATRIGHT, K.M. et al, 2003). De plus, la caspase 6 est activée par la caspase 3 activée (HIRATA, H. et al, 1998). Les voies intrinsèque et extrinsèque convergent au niveau des caspases effectrices et une amplification de la voie intrinsèque peut survenir suite à l'activation de la voie extrinsèque.

La voie intrinsèque est activée par le dérèglement de la mitochondrie orchestré par les protéines de la famille Bcl-2 sous l'expression d'un oncogène ou encore d'un dommage à l'ADN (KASTAN, M.B. et al, 1991 et ZHANG, H. et al, 1998). La réception d'un signal apoptotique entraîne la stabilisation et l'activation de la protéine p53 par des modifications post-traductionnelles, par exemple, la phosphorylation de la sérine en position 15 de p53 (BUSCHMANN, T. et al, 2001) ou encore une acétylation dans la partie C-terminal de la protéine (GU, W. et ROEDER, R.G., 1997). En conditions normales, p53 est inhibée et dégradée par son interaction avec Mdm2 (*murine double minute 2*). En conditions apoptotiques, p53 est phosphorylée rapidement suite au signal apoptotique et l'interaction avec Mdm2 n'est plus possible (SCHON, O. et al, 2002). p53 peut ainsi être stabilisée et son accumulation dans le noyau de la cellule lui permet de contrôler la transcription de ses cibles, en activant l'expression de certaines protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 et en inhibant celle des protéines anti-apoptotiques de la même famille (KURIBAYASHI, K. et EL-DEIRY, W.S., 2008).

Les protéines de la famille Bcl-2 sont divisées en 3 sous-familles : les anti-apoptotiques, les pro-apoptotiques ou activateurs et les membres BH3 seulement ou sensibilisateurs (figure 2) (CORY, S. et al, 2003).

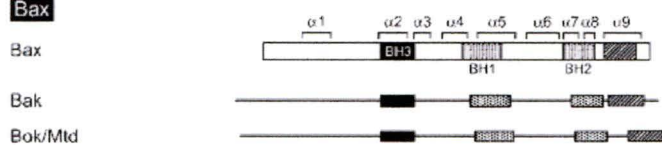
anti-apoptotiques  
sous-famille

**Bcl-2**



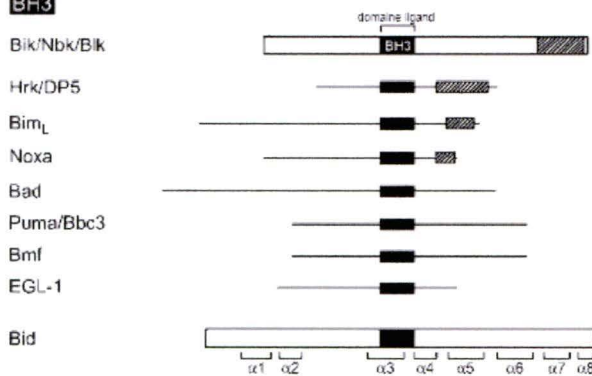
pro-apoptotiques  
sous-famille

**Bax**



sous-famille

**BH3**



**Figure 2. La famille Bcl-2**

La famille Bcl-2 est divisée en trois sous-familles, soient les anti-apoptotiques semblables à Bcl-2, les pro-apoptotiques ayant 3 domaines BH et les activateurs ou sensibilisateurs de l'apoptose ne possédant que le domaine BH3. Voir le texte pour plus de détails, adapté de CORY, S. et al, 2003.

La sous-famille Bcl-2 est constituée de protéines anti-apoptotiques contenant les domaines BH1 (*Bcl-2 Homology-1*), BH2, BH3 et BH4 qui, en conditions normales, protègent la cellule et empêchent l'induction de l'apoptose en inhibant les protéines pro-apoptotiques (YIN, X.-M., 1994). La deuxième sous-famille, composée



du trio Bax, Bak et Bok qui sont semblables à Bcl-2 en structure et en séquence, mais ne possèdent que les domaines BH1, BH2 et BH3, remplit un rôle tout à fait opposé au groupe de Bcl-2 (HSU, S.Y. et HSUEH, A.J., 1998). La troisième sous-famille comprend les protéines, Bad, Bim, Bmf, Bid, Bik, HRK, EGL-1, Puma et Noxa. Ces protéines ne possèdent qu'un seul domaine en commun avec les protéines de la famille Bcl-2, soit le domaine BH3 (SUBRAMANIAN, T. et al, 2007). Certaines de ces *BH3-only* sont des activateurs, comme Bim ou Bid, qui vont interagir avec les protéines pro-apoptotiques Bax ou encore Bak entraînant un changement de conformation de celles-ci, permettant à Bax et Bak d'hétérodimériser avec d'autres protéines et de perméabiliser la membrane mitochondriale en formant des pores dans celle-ci (LETAI, A. et al, 2002). Les gènes de Puma (*p53-upregulated modulator of apoptosis* ou *bbc3*) et de Noxa (*phorbol-12-myristate-13-acetate induced protein-1*) possèdent chacune des séquences de liaison à p53 dans leur premier intron (ODA, E. et al, 2000 et NAKANO, K. et VOUSDEN, K.H., 2001). Puma et Noxa jouent un rôle important dans l'induction de l'apoptose dépendante de p53, car elles sont des cibles transcriptionnelles directes de p53 (SHIBUE, T. et al, 2003). De plus, il a été démontré que ces deux protéines pro-apoptotiques sont aussi des cibles de TAF68 (*TBP associated factor 6 isoform delta*) (WILHELM, E. et al, 2008). Puma a un rôle large d'inhibiteur des protéines appartenant à la famille des homologues à Bcl-2, car il peut tous les lier tout comme Bim (CHEN, L. et al, 2005). Puma lie notamment Bcl-x<sub>L</sub> permettant le relâchement de p53 qui y est séquestrée (CHIPUK, J.E., 2005). Contrairement à Puma, Noxa a un rôle plus limité (VILLUNGER, A. et al, 2003). Noxa est aussi capable d'inhiber les facteurs anti-apoptotiques des homologues à Bcl-2, mais ne lie que Mcl-1 (*myeloid cell leukemia protein-1*) et Bfl-1/A1 (*Bcl-2 related*

*protein A1*) (CHEN, L. et al, 2005), ce qui va indirectement activer les facteurs pro-apoptose, Bax et Bak (SHIBUE, T. et al, 2003). Puma peut réguler l'apoptose de façon indépendante de p53 selon qu'il y ait dommage à l'ADN, stress par les glucocorticoïdes ou encore une carence en facteurs de croissance (HAN, J.W. et al, 2001). Lors de l'apoptose, le cytochrome c, relâché de la mitochondrie perméabilisée, lie Apaf-1 (*apoptotic peptidase activating factor-1*) qui hydrolyse le dADP en ADP libérant ainsi le domaine CARD (*caspase recruitment domain*) de Apaf-1 ce qui permet la liaison de la procaspase 9. L'assemblage du cytochrome c avec Apaf-1 et la procaspase 9 forme l'apoptosome. Ce complexe étant multimérique, cela permet d'activer la procaspase 9 par clivage (ZOU, H. et al, 1999). La caspase 9 active peut, par la suite, activer les caspases effectrices, c'est-à-dire les caspases 3, 6 et 7 par clivage de leur *linker* afin qu'elles forment des hétérotétramères actifs (RIEDL, S.J. et al, 2001). Les deux voies apoptotiques sont activées différemment et n'impliquent pas les mêmes protéines, mais les deux sont régulées par l'expression génique.

### ***Initiation de la transcription***

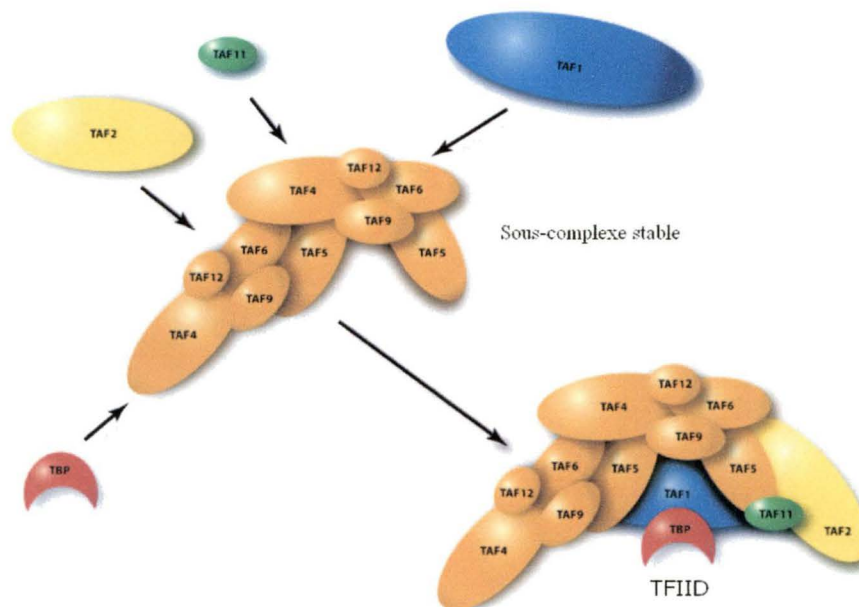
La régulation de l'expression génique se fait surtout au niveau de la transcription de l'ADN génomique par une des ARN polymérases existantes. Trois ARNs polymérases sont responsables de l'expression génique chez les eucaryotes (EGLOFF, S. et MURPHY, S., 2008). L'ARN polymérase I est responsable de la transcription des ARNs ribosomaux 18S et 28S seulement (LAFERTÉ, A. et al, 2006). L'ARN polymérase III transcrit un petit nombre de gènes très courts, ce qui inclut l'ARN ribosomal 5S et les ARN de transfert (ROBERTS, D.N. et al, 2003).

L'ARN polymérase II est responsable de la transcription pour les gènes codants pour des protéines, ainsi que la majorité des gènes codants pour de petits ARNs non-codants (snRNAs) (LEE, Y. et al, 2004). La transcription se divise en trois phases, soit l'initiation, l'élongation et la terminaison (BORUKHOV, S. et NUDLER, E., 2007). L'initiation de la transcription commence par la reconnaissance du promoteur génique par les facteurs de transcription (FAIGER, H. et al, 2007). Les éléments de reconnaissance du promoteur sont, en général, la boîte TATA, BRE (*TFIIB recognition element*), Inr (*initiator*), MTE (*motif ten element*), DPE (*downstream promoter element*) et DCE (*downstream core element*) (JUVEN-GERSHON, T. et al, 2008). Le plus souvent, ces motifs de reconnaissance se retrouvent dans les promoteurs focalisés, c'est-à-dire des promoteurs où l'initiation de la transcription ne prend place qu'à un seul endroit ou dans un agglomérat de sites d'initiation comprenant plusieurs nucléotides. Ces promoteurs focalisés représentent moins du tiers des promoteurs chez les vertébrés. Les autres promoteurs sont appelés des promoteurs dispersés (JUVEN-GERSHON, T. et al, 2008). Plusieurs complexes multiprotéiques sont impliqués dans l'initiation de la transcription. Ils sont nommés les facteurs généraux de transcription pour l'ARN polymérase II (TFIIX) et comprennent les complexes TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF et TFIIH (MATSUI, T., 1980). La transcription débute lorsque la protéine de liaison à la boîte TATA (TBP) se lie au motif TATAA au site d'initiation de la transcription (FAIGER, H. et al, 2007). Les sous-unités de TFIID, aussi co-facteurs de transcription, les TAFs (*TBP associated factors*) viennent s'ajouter formant ainsi le complexe TFIID (CHIANG, C.-M. et al, 1983). Par la suite, les autres facteurs généraux de transcription viennent rejoindre TFIID au site du promoteur (REINBERG, D. et al, 1987). TFIIA est un

élément critique de la transcription, car il stabilise l'interaction TBP-ADN en liant TBP (IMBALZANO, A.N. et al, 1994). TFIIB est impliqué dans la sélection des sites d'initiation de la transcription, possiblement, en déterminant une distance entre le site d'initiation et le promoteur en liant les éléments BRE<sup>u</sup> (*BRE upstream*) et BRE<sup>d</sup> (*BRE downstream*) (BURATOWSKI, S., 1989). TFIIF se lie ensuite à l'ARN polymérase II et permet la suppression des interactions non-spécifiques à l'ADN, ainsi que la stabilisation du complexe de pré-initiation (KILLEEN, M.T. et GREENBLATT, J.F., 1992). TFIIE, quant à lui, joue un rôle dans l'ouverture et le maintien de la structure simple brin de l'ADN en séquestrant TFIIH dans le complexe de pré-initiation. De plus, il stimule l'activité CTD (*C-terminal repeat domain of RNA polymerase II*) kinase et ATPase de TFIIH qui est le dernier à se joindre aux facteurs généraux de transcription du complexe de pré-initiation. TFIIH possède des sous-unités ayant minimalement trois activités enzymatiques, soit une activité ATPase ADN-dépendant, une hélicase ATP-dépendante et une CTD kinase. TFIIH joue donc un rôle dans le déroulement de l'ADN en structure simple brin (HOLSTEGE, F.C.P. et al, 1996). La liaison de l'ARN polymérase II aux facteurs généraux de transcription vient compléter la formation du complexe de pré-initiation (PIC). La reconnaissance des éléments promoteurs de la transcription par le complexe multiprotéique TFIID est l'étape-clé de l'initiation de la transcription et de la régulation de l'expression génique (MÜLLER, F. et al, 2007).

## ***TFIID***

TFIID est un complexe multiprotéique qui permet l'initiation de la transcription et qui est formé de TBP, la protéine de liaison à la boîte TATA et, d'au moins 14 TAFs, les facteurs associés à TBP. De plus, l'architecture de TFIID est trilobaire (figure 3). Ce complexe est un élément-clé de l'initiation de la transcription, car il permet l'assemblage du PIC au promoteur des gènes.



**Figure 3. Assemblage trilobaire de TFIID.** Voir texte pour plus de détails (adapté de WRIGHT, K.J. et al, 2006).

TBP se lie à la boîte TATA et amène les TAFs à former un complexe en interagissant, soit avec TBP, soit avec d'autres éléments activateurs sur la séquence promotrice. Chacun des TAFs possède différentes fonctions qui permettent l'assemblage de TFIID ou encore de distinguer un promoteur d'un autre (ALBRIGHT, S.R. et TJIAN, R., 2000). TAF1 (TAF<sub>II</sub>250) est une protéine bipartite qui possède une activité kinase et une activité HAT (histone acétyltransférase). Son activité sérine/thréonine kinase permet la phosphorylation de la sous-unité RAP74 de TFIIF (DIKSTEIN, R. et al,

1996). L'acétylation des histones est aussi associée à l'activité de TAF1 qui favorise ainsi l'accès de TFIID à la boîte TATAA du promoteur (IMHOF, A. et al, 1997). TAF2 (TAF<sub>II</sub>150) fonctionne en dimère avec TAF1 afin de reconnaître l'élément initiateur (Inr) sur le promoteur du gène à transcrire. Bien qu'aucune séquence n'ait été identifiée pour la liaison de TAF2 seule à l'ADN, celle-ci est influencée par la structure secondaire de l'ADN (CHALKLEY, G.E. et VERRIJZER, C.P., 1999). TAF3 (TAF<sub>II</sub>140) est la partenaire d'interaction de TAF10 (TAF<sub>II</sub>30). Elle peut aussi interagir avec le domaine régulateur et d'oligomérisation en C-terminal de p53 et cela lui permet d'inhiber l'activité transcriptionnelle de p53 (BERECZKI, O. et al, 2008). Elle possède aussi une séquence de localisation nucléaire (NLS) (SOUTOGLOU, E. et al, 2005). TAF4, aussi appelée TAF4a (TAF<sub>II</sub>130), possède un homologue spécifique à certaines cellules, TAF4b (TAF<sub>II</sub>105) (DIKSTEIN, R. et al, 1996). TAF4 peut lier directement des homodimères des activateurs Sp1 et c-jun (ROJO-NIERSBACH, E. et al, 1999). Par ailleurs, elle peut former un dimère avec TAF12 (TAF<sub>II</sub>20). De plus, chez la levure, TFIIA se lie à TAF4 dans le complexe de pré-initiation préformé. TAF4b est exprimée surtout au niveau des lymphocytes différenciés, des testicules et des cellules de la granulosa de l'ovaire. TAF4b se retrouve dans le complexe TFIID avec son homologue ubiquitaire, TAF4a. Le complexe TFIID contenant TAF4b et TAF4a lie le promoteur en premier, ce qui entraîne le recrutement des activateurs (LIU, W.-L. et al, 2008). TAF5 (TAF<sub>II</sub>100) est une sous-unité clé pour l'assemblage de TFIID. L'action de TAF5 est médiée par ses deux motifs conservés en position N-terminal. La forme de son dimère est allongée et flexible lui permettant de réorganiser les trois lobes de TFIID lors de la reconnaissance des promoteurs (BHATTACHARYA, S. et al, 2007). TAF6

(TAF<sub>II</sub>70/80) est une sous-unité possédant 4 isoformes, TAF6 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  (WEINZIERL, R.O. et al, 1993). TAF6 $\alpha$  forme un dimère avec TAF9 (TAF<sub>II</sub>31) par l'interaction de leur domaine *histone fold* (HISATAKE, K. et al, 1995). TAF6 et le dimère TAF6-TAF9 se lient à l'élément promoteur DPE (*downstream promoter element*) (SHAO, H. et al, 2005). Récemment, il a été prouvé que le niveau d'expression de l'ARN messenger de TAF6 est augmenté dans les cancers du sein inflammatoires (DRESSMAN, H.K. et al, 2006). Une autre étude portant sur les adénocarcinomes des poumons a démontré que le gène de TAF6 est surexprimé dans ce type de cancer (AVIEL-RONEN, S. et al, 2008). TAF7 (TAF<sub>II</sub>55) peut lier TAF1, inhibant son activité acétyltransférase jusqu'à ce que le complexe de pré-initiation soit complètement formé. TAF7 peut aussi inhiber l'activité de phosphorylation de TFIIH sur le CTD de l'ARN polymérase II retardant ainsi la formation de la coiffe en 5'. TAF7 interagit aussi avec le facteur d'élongation P-TEFb (*positive transcription elongation factor b*). TAF7 est impliqué dans l'assemblage du PIC, ainsi que dans l'élongation de la chaîne naissante d'ARN pré-messager (GEGONNE, A. et al, 2008). TAF8 (TAF<sub>II</sub>43) forme un dimère avec TAF10 (TAF<sub>II</sub>30) par interaction de leur motif *histone-fold* et elle possède une séquence de localisation nucléaire (NLS) (SOUTOGLU, E. et al, 2005). TAF8 interagit aussi fortement avec les TAF6 et TAF11. Il a été constaté que l'expression de TAF8 augmente significativement et spécifiquement comparé aux autres TAFs pendant la différenciation des préadipocytes en adipocytes. Cela signifie qu'il peut modifier les cibles transcriptionnelles de TFIID afin de favoriser la voie de l'adipogénèse des fibroblastes lors de leur différenciation (GUERMAH, M. et al, 2003). TAF9 (TAF<sub>II</sub>31) est la sous-unité de TFIID qui interagit avec p53. Elle permet la

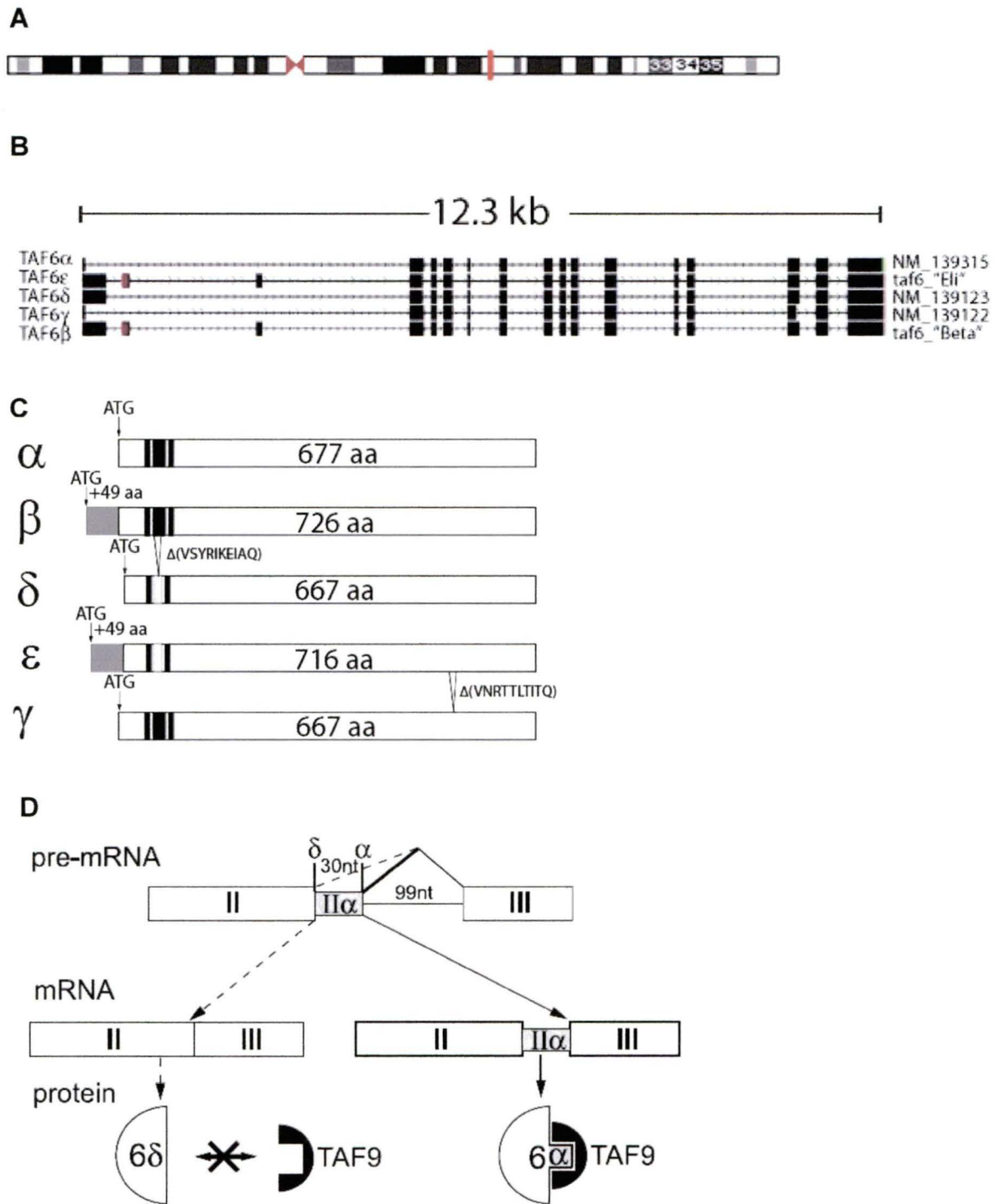
stabilisation de p53 en inhibant l'interaction mdm2-p53. De plus, comme TAF9 interagit par son domaine C-terminal avec p53 et forme un dimère avec TAF6 par son domaine N-terminal, elle permet de faire le lien entre p53 et la machinerie transcriptionnelle (THUT, C.J. et al, 1995). TAF10 (TAF<sub>II</sub>30) est une TAF dont l'action est cellule spécifique et est impliqué dans les voies de différenciation, surtout chez la souris (TATARAKIS, A. et al, 2008). Elle peut interagir avec TAF3, TAF8 et SPT7Like par ses trois motifs *histone-fold*. Lorsque cette TAF est monomérique, elle est séquestrée au cytoplasme, car elle ne possède pas de séquence de localisation nucléaire (NLS). Par contre, son interaction avec ses partenaires lui permet d'être transporté au noyau par les importines, car TAF3, TAF8 et SPT7Like possèdent cette séquence. La partenaire d'interaction de TAF10 détermine quel complexe de pré-initiation sera utilisé pour la transcription, soit TFIID ou TF<sub>II</sub>C (*TBP-free TAF<sub>II</sub> complex*) (SOUTOGLOU, E. et al, 2005). TAF11 (TAF<sub>II</sub>28) interagit avec TBP et est une TAF périphérique de TFIID, mais elle n'est pas nécessaire pour la forme trilobée de TFIID (WRIGHT, K.J. et al, 2006). Elle interagit avec TFIIA par deux régions, soit le motif *histone fold* et un domaine N-terminal. De plus, TAF11 augmente la formation du complexe TFIIA-TBP-ADN et aide à sa stabilisation (ROBINSON, M.M. et al, 2005). TAF12 (TAF<sub>II</sub>20) interagit directement avec TBP et TAF4 (MENGUS, G. et al, 1995). Récemment, il a été démontré que TAF12 régule l'expression d'E-cadhérine, plus particulièrement, dans les cellules ayant une faible concentration d'E-cadhérine (VOULGARI, A. et al, 2008). TAF13 (TAF<sub>II</sub>18) interagit via son motif *histone-fold* avec TAF11 (BIRCK, C. et al, 1998). De plus, TAF11 et TAF13 sont les premières à entrer en contact avec TBP lors du recrutement médié par les activateurs (SHEN, W.-C. et al, 2003). TAF14 est une composante non



seulement de TFIID, mais aussi de TFIIF, du complexe de remodelage de la chromatine SWI / SNF et INO80 ainsi que NuA3, l'acétyltransférase de l'histone H3 chez la levure (LIM, M. K. et al, 2007). Les TAFs interagissent entre elles par leur motif *histone fold*. Cette interaction assure l'intégrité de TFIID. Des études ont démontré une similarité de stoechiométrie et de structure entre TFIID et l'octamère d'histones formant la chromatine (SELLECK, W. et al, 2001 et GANGLOFF, Y.G. et al, 2001)

### ***TAF6 $\delta$***

TAF6 est une sous-unité de TFIID et possède au moins 5 isoformes produits par épissage alternatif, soit alpha ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gamma ( $\gamma$ ), delta ( $\delta$ ) et epsilon ( $\epsilon$ ) (figure 4). Son gène est situé sur le chromosome 7 (figure 4A). Les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  possèdent un exon 2 complet, mais l'isoforme  $\beta$  débute à un autre ATG que celui utilisé par  $\alpha$ . Ainsi, TAF6 $\beta$  possède 49 acides aminés en plus que l'isoforme  $\alpha$  (figure 4C). L'isoforme  $\gamma$  possède 10 acides aminés en moins que l'isoforme  $\alpha$  en enlevant une partie de l'exon 13 (figure 4C). L'isoforme  $\delta$  possède aussi 10 acides aminés en moins que TAF6 $\alpha$ , mais c'est une partie alternative de l'exon 2 qui est enlevée dans cet isoforme (figure 4C). L'isoforme TAF6 $\epsilon$  possède 10 acides aminés en moins comme TAF6 $\delta$  et il possède 49 acides aminés en plus dans sa région 5' (figure 4C). (WEINZIERL, R.O. et al, 1993, BELL, B. et al, 2001).



**Figure 4. Les 5 isoformes de TAF6.** A) Schéma du chromosome 7 et la localisation de TAF6 sur celui-ci (en rouge). B) Les cinq isoformes d'ARN pré-messager de TAF6 présentés de façon schématique. Les numéros à droite et la nomenclature de gauche sont tirés de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), taf6ε est adapté de BELL, B. et al, 2001 (initialement nommé TAF6δ) et taf6\_"Beta" est adapté de WEINZIERL, R.O. et al, 1993. C) Les 5 isoformes protéiniques de TAF6, les boîtes noires représentent les 3 hélices du motif *histone fold* et la boîte grise des isoformes TAF6δ et TAF6ε montre l'absence de 10 acides aminés dans le motif *histone fold* (Voir

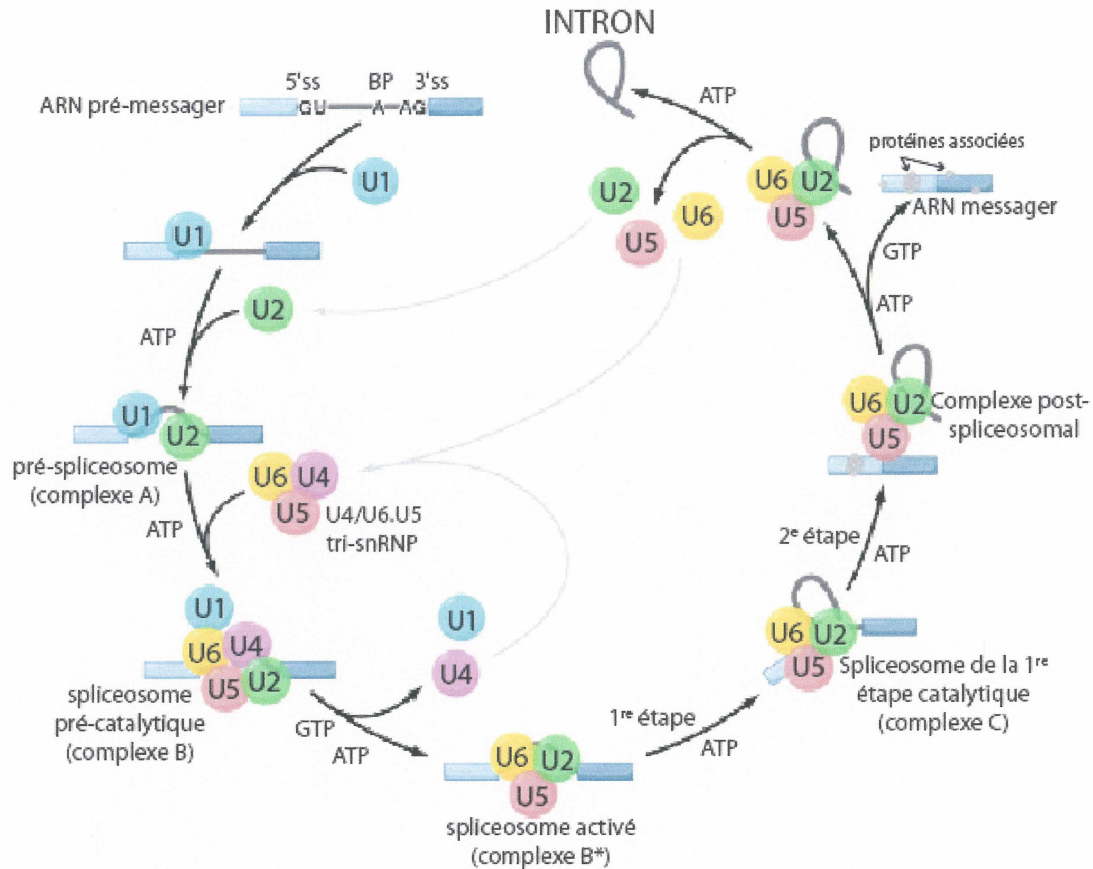
texte pour plus de détails, adapté de WANG, W. et al, 2004). D) ARN messager de TAF6 $\alpha$  et TAF6 $\delta$ . La liaison de TAF6 $\alpha$  avec TAF9 est possible due à la présence de 30 nucléotides dans le motif *histone fold* de TAF6 $\alpha$  (voir texte pour plus de détails, adapté de WILHELM, E. et al, 2008).

L'isoforme  $\delta$  a été identifié pour la première fois en 2001, lors de l'induction de la différenciation et de l'apoptose subséquente des cellules HL-60 par de l'acide rétinoïque. La surexpression de TAF6 $\delta$  provoque aussi l'apoptose des cellules HeLa (BELL, B. et al, 2001). Il est donc pro-apoptotique et possède 10 acides aminés en moins dans l'exon 2 que TAF6 $\alpha$ . Ces 10 acides aminés se trouvent au niveau du motif *histone fold* qui permet la dimérisation de TAF6 avec TAF9 (figure 4D) (HISATAKE, K. et al, 1995). Cela signifie donc que lorsque TAF6 $\delta$  est présent dans le complexe TFIID, TAF9 n'y est pas. Les groupes de gènes transcrits par TFIID comprenant TAF6 $\delta$  ne sont pas impliqués dans les mêmes voies métaboliques que ceux transcrits lorsque TAF6 $\alpha$  entre dans la composition de TFIID et qui sont majoritairement anti-apoptotiques. De plus, l'apoptose induite par TAF6 $\delta$  est indépendante de p53, mais la voie par laquelle TAF6 $\delta$  induit l'apoptose et le signal déclenchant l'épissage alternatif de TAF6 $\delta$  demeurent inconnus (WILHELM, E. et al, 2008). Selon nos données non publiées, TAF6 $\delta$  interagirait directement avec p53. L'étude présentée dans ce mémoire porte sur l'épissage alternatif de TAF6 $\delta$ , car il est apparent que TAF6 $\delta$  propose une nouvelle voie apoptotique indépendante de p53, mais en interaction avec cette dernière.

## ***Épissage et épissage alternatif***

À la suite de la transcription, les ARNs pré-messagers doivent être maturés afin d'être transportés et traduits en protéines. La maturation s'effectue en trois étapes de manière post-transcriptionnelle ou co-transcriptionnelle. L'ajout d'une coiffe à l'extrémité 5' et de la queue polyA à l'extrémité 3' permet d'assurer la stabilité de l'ARN messenger et son déplacement au cytoplasme (LUNA, R. et al, 2008). L'épissage est le processus par lequel des portions d'un transcrit naissant sont exclues de l'ARN messenger mature. L'épissage alternatif est la forme d'épissage qui permet d'assurer la diversité protéomique et permet un certain niveau de régulation post-transcriptionnel (POZZOLI, U. et SIRONI, M., 2005).

L'épissage est accompli par environ une centaine de protéines et de cinq petits ARNs nucléaires (U1, U2, U4, U5 et U6) qui forment des complexes appelés U snRNP et nommés en fonction de l'ARN présent dans le complexe (ZHOU, Z. et al, 2002). Quatre éléments *cis* ARN sont importants pour la reconnaissance par les complexes U snRNPs, soit le site 5' d'épissage, le site 3' d'épissage, le point de branchement et la séquence riche en pyrimidine situé près du site 3' d'épissage (LIM, L.P. et BURGE, C.B., 2001). L'épissage procède en deux étapes qui font appel à la formation du spliceosome (figure 5).



**Figure 5. Mécanisme de l'épissage.** Assemblage du spliceosome et les deux réactions de transtérification (voir texte pour plus de détails, adapté de WAHL, M.C., 2009).

Dans un premier temps, U1 snRNP se lie au site 5' d'épissage au niveau du dinucléotide GU avec l'aide de protéines SR qui permettent une meilleure reconnaissance du site d'épissage (KOHTZ, J.D. et al, 1994). Puis, U2 snRNP se lie au site 3' d'épissage par ses sous-unités, U2AF<sup>65</sup> et U2AF<sup>35</sup>. Les protéines SR aident U2 snRNP et jouent un rôle dans la reconnaissance du site 3' d'épissage (KENT, O.A. et al, 2005). La sous-unité U2AF<sup>65</sup> possède un domaine RS et trois domaines de reconnaissance de l'ARN (RRM) (ZAMORE, P.D. et al, 1992). Deux des trois RRM, soit RRM1 et RRM2, ont une grande affinité pour les séquences riches en pyrimidine et, ainsi, U2AF<sup>65</sup> se lie à la séquence riche en pyrimidine près du site 3' d'épissage (SICKMIER, E.A. et al, 2006). Quant à U2AF<sup>35</sup>, il possède un domaine d'interaction

avec U2AF<sup>65</sup> et un autre domaine d'interaction protéine-protéine pour les épissages dépendants des sites activateurs (ESE : *exonic splicing enhancer*) (ZUO, P et MANIATIS, T., 1996). Il est aussi reconnu pour stabiliser U2AF<sup>65</sup> sur les ARNs dont la séquence riche en pyrimidine des introns AG-dépendant n'est pas optimale (WU, S. et al, 1999). U2AF<sup>65</sup> est, par contre, la sous-unité la plus importante, car elle permet de plier l'ARN afin de rapprocher les sites 5' et 3' d'épissage (KENT, O.A. et al, 2003). Puis, vient s'ajouter à cela le tri-snRNP, U4/U6.U5 snRNP pour former le spliceosome complet (BEHRENS, S.E. et LÜHRMANN, R., 1991). Des réarrangements fonctionnels ont alors lieu afin d'activer le spliceosome. U1 snRNP cesse alors d'interagir avec le site 5' d'épissage et il sort alors du spliceosome (STALEY, J.P. et GUTHRIE, C., 1999). De même, le déroulement du tri-snRNP fait sortir U4 snRNP du spliceosome. Des interactions se forment entre U2 snRNP et U6 snRNP ainsi qu'entre U6 snRNP et le site 5' d'épissage, ce qui assure une meilleure reconnaissance du site 5' d'épissage et renforce le contact avec le point de branchement (HAUSNER, T.P. et al, 1990, STALEY, J.P. et GUTHRIE, C., 1999). Le spliceosome ainsi activé permet aux deux réactions de transestérification de se produire. Ainsi, l'adénosine au point de branchement peut effectuer une attaque nucléophile de son 2'OH sur le site 5' d'épissage libérant un phosphate en 5'. Cela forme le lariat intronique et un réarrangement conformationnel a lieu afin de replacer l'exon 5' pour qu'il puisse effectuer la seconde attaque nucléophile sur le site 3' d'épissage. Ces réactions de transestérification permettent de lier les deux exons et de relâcher l'intron sous forme de lariat qui sera dégradé (MASCHHOFF, K.L. et PADGETT, R.A., 1992).

L'analyse des données de séquençage des ARNs démontre que 92 à 95% des gènes humains sont épissés de façon alternative ainsi, l'épissage alternatif serait le mécanisme de base de l'épissage (WANG, E.T. et al, 2008). Selon différents schémas d'épissage alternatif, un gène peut produire deux à trois transcrits en moyenne. La plupart des épissages alternatifs peuvent être classés en sept patrons, soit l'exon cassette, les exons mutuellement exclusifs, les sites d'épissage 5' et 3' alternatif, la rétention d'intron, les promoteurs alternatifs et les sites de polyadénylation alternatifs (BLENCOWE, B.J., 2006). Parmi ces différents profils d'épissage, le gène de TAF6 présente un patron de sites d'épissage 5' alternatif.

La régulation de l'épissage s'effectue par la liaison de protéines aux séquences ARN activatrices et inhibitrices situées dans les exons et les introns. Ces sites sont présents afin de réguler la force relative des sites d'épissage utilisés pour l'épissage alternatif. Cela permet de définir l'exon à conserver ou à enlever. L'interaction entre des protéines reconnaissant les sites 5' et 3' d'épissage de part et d'autre de l'exon permet cette définition. Dans l'épissage alternatif, la définition de l'intron est aussi importante (WANG, Z. et BURGE, C.B., 2008). Les protéines qui s'associent majoritairement aux séquences activatrices retrouvées dans les exons (ESE) et dans les introns (ISE) sont les protéines SR, bien que certaines exceptions existent telles que la protéine SF2/ASF qui peut jouer un rôle inhibiteur plutôt qu'activateur s'il lie l'ARN pré-messager dans l'intron plutôt que dans l'exon (KANOPKA, A. et al, 1996). Il a aussi été montré que la protéine SRp30c peut jouer un rôle inhibiteur en réprimant l'utilisation d'un site 3' d'épissage lorsqu'elle se lie à l'élément CE9 dans l'intron situé entre l'exon 7B et l'exon 8 de l'ARN pré-messager de hnRNP A1 (SIMARD, M.J. et CHABOT, B., 2002). Les protéines hnRNPs lient, quant à elles,

les séquences inhibitrices dans l'exon (ESS) et dans l'intron (ISS). Elles peuvent aussi interagir entre elles, par exemple hnRNP A et B, afin de modifier la structure de l'ARN pré-messager d'un transcrit, ce qui va rapprocher deux exons (MARTINEZ-CONTRERAS, R. et al, 2006). Ce modèle *looping out* montre bien la dualité des rôles des protéines hnRNPs, car en interagissant de cette manière, elles peuvent entraîner l'inhibition d'un site d'épissage et en favoriser un autre (MARTINEZ-CONTRERAS, R. et al, 2006). D'autres exceptions parmi ces protéines majoritairement inhibitrices, telles que la protéine hnRNP H qui peut aussi jouer un rôle d'activateur (CHOU, M.-Y. et al, 1999) ou hnRNP K qui peut lier des sites activateurs intronique (ISE) et, ainsi permettre d'épisser un exon alternatif comme, par exemple, dans le gène de la  $\beta$ -tropomyosin chez le poulet (EXPERT-BEZANÇON, A. et al, 2002). De plus, une activité bidirectionnelle de hnRNP K, autant activatrice qu'inhibitrice a été mise en évidence dans plusieurs des ARNs pré-messagers affectés par hnRNP K (VENABLES, J.P. et al, 2008). L'épissage alternatif implique des sites 5' et 3' d'épissage dont les forces relatives ne permettent pas à U1 snRNP et à U2 snRNP de les lier facilement; ainsi des protéines SR sont impliquées au tout début de l'épissage afin d'aider U1 et U2 à lier les sites 5' et 3' d'épissage. De plus, si le site 5' d'épissage est très faible, les sites activateurs vont permettre la stabilisation des interactions sur le site 3' d'épissage (STAKNIS, D. et REED, R., 1994). La structure secondaire joue aussi un rôle dans l'épissage alternatif, car la formation de structure de type tige-boucle permet de rapprocher les sites 5' et 3' d'épissage et de favoriser ou inhiber l'épissage à ces endroits (BURATTI, E. et BARALLE, F.E., 2004). La formation d'une structure secondaire peut entraîner des modifications dans la liaison d'U1 snRNP sur l'ARN pré-messager ou encore affecter



d'autres étapes de l'assemblage du spliceosome, ce qui entraîne la modification de l'épissage des exons de cet ARN pré-messager (BLANCHETTE, M. et CHABOT, B., 1997 et, HUTTON, M. et al, 1998).

D'autres facteurs peuvent influencer l'épissage alternatif. L'environnement cellulaire est un de ces facteurs et peut modifier l'épissage alternatif de certains ARNs pré-messagers par des signaux intra- et extracellulaires. Cela peut affecter l'épissage alternatif d'un ARN pré-messager de plusieurs façons, entre autres, par des modifications post-traductionnelles sur les protéines d'épissage (SHIN, C. et MANLEY, J.L., 2004) ou encore par un changement dans la localisation de facteurs d'épissage (ALLEMAND, E. et al, 2005). Par exemple, hnRNP K est une protéine abondante et ubiquitaire qui est constitutivement liée à une large diversité d'ARN messagers ou d'acides nucléiques. En réponse à des facteurs de croissance ou encore à un stress oxydatif, hnRNP K est phosphorylée, ce qui permet son détachement des éléments *cis* permettant à la transcription ou la traduction de se produire. (OSTROWSKI, J. et al, 2000). La phosphorylation de hnRNP A1 sur la séquence M9, quant à elle, empêche son transport par la protéine Transportine vers le noyau, où l'épissage s'effectue. hnRNP A1 ne peut donc pas contrer l'effet des protéines SR et, ainsi, la reconnaissance des sites d'épissage s'en trouve affectée (ALLEMAND, E. et al, 2005).

### ***Éléments répétitifs Alus***

Les introns sont reconnus pour contenir des éléments répétitifs qui peuvent influencer l'épissage des ARNs pré-messagers. Les éléments répétitifs *Alus*

représentent la grande majorité de ces éléments (LEI, H. et VOŘECHOVSKÝ, I., 2005). Ces éléments rétrotransposables comptent pour plus de 10% du génome (LI, W.H. et al, 2001). Il existe trois sous-familles *Alus* regroupées selon leur âge estimé, soit la sous-famille *Alu-J* qui remonterait à 55 millions d'années, les *Alus-Sx* (ou *Alu-S*), comptent pour la moitié des répétitions retrouvées dans le génome et seraient âgés de 40 millions d'années. La sous-famille, *Alu-Sb* (ou *Alu-Y*), est la plus jeune et est seulement retrouvée chez les humains et les singes anthropoïdes (chimpanzé, gorille et orang-outan) (MAKAŁOWSKI, W. et al, 1994). Les éléments *Alus* sont typiquement composés de 300 nucléotides et se présentent sous la forme d'un dimère. Deux éléments de séquence similaire sont séparés par une courte séquence liante riche en adénosine. Les éléments mobiles *Alus* possèdent aussi une queue polyA ayant normalement entre 20 et 100 bases (LEV-MAOR, G. et al, 2003). Il existe deux mécanismes permettant l'introduction des éléments *Alus* dans les régions codantes pour des protéines. Le premier mécanisme est la rétrotransposition qui implique qu'un élément *Alu* actif est rétrotranscrit et introduit subséquentement dans la région codante. Le deuxième mécanisme est l'épissage d'un *Alu* intronique dans la région codante. Ce mécanisme introduit autant les *Alus* modifiés par des mutations que ceux qui ne peuvent pas être introduits par rétrotransposition. (MAKAŁOWSKI, W. et al, 1994). Les éléments *Alus* ne sont pas seulement retrouvés dans les introns, il est aussi possible que les exons en contiennent, cependant, dans ce cas, ils s'étendent dans l'intron flanquant cet exon. Ils peuvent alors être introduits dans l'ARN messager en créant un site 5' ou 3' d'épissage suite à une mutation ponctuelle au niveau de l'ADN génomique (SOREK, R. et al, 2002 et 2004, LEV-MAOR, G. et al, 2003). De plus, ils peuvent entraîner la terminaison prématurée d'un transcrit en introduisant un codon

Stop, particulièrement dans l'orientation sens, ce qui va conduire à la dégradation du transcrit tronqué (MAKAŁOWSKI, W. et al, 1994). La présence d'éléments répétitifs *Alus* dans les introns et les exons d'un gène entraîne des modifications de l'épissage des ARNs messagers, ils modifient ainsi le patron d'expression génique en se retrouvant dans les régions promotrices et dans les régions en amont des gènes codant pour des protéines et peuvent même amener la répression de l'expression génique en étant introduits dans un gène. Cela entraîne une mutagénèse et est associé à 0.1% des maladies humaines, incluant les cancers familiaux, les maladies métaboliques et sanguines (CALLINAN, P.A. et al, 2005). Dans le cancer du sein, deux éléments *Alus* ont été détectés dans l'ARN messager de TAF6. Puisque ces ARNs messagers semblent surexprimés par rapport aux cellules normales, il serait important de connaître la base moléculaire sur laquelle repose cette surexpression de l'ARN messager TAF6 contenant des éléments répétitifs *Alus* (WANG, W. et al, 2004).

## **OBJECTIFS SPÉCIFIQUES**

L'apoptose des cellules HL-60 par suite d'expériences de différenciation de ces dernières à l'aide d'acide rétinoïque a permis de mettre en évidence l'expression de l'ARN messager d'un nouvel isoforme de TAF6, TAF6 $\delta$ . (BELL, B. et al, 2001) Plus récemment, il a été démontré que TAF6 $\delta$  induit une apoptose indépendamment de p53 et donc, que TAF6 $\delta$  possède sa propre voie apoptotique (WILHELM, E. et al, 2008). En conditions normales, les cellules produisent une grande quantité de TAF6 $\alpha$ , mais très peu de TAF6 $\delta$ . Par contre, lors de l'induction de l'apoptose sous l'effet d'un signal encore inconnu, les cellules vont exprimer une grande quantité de TAF6 $\delta$  par rapport à TAF6 $\alpha$ . Ainsi, la régulation de l'expression du co-facteur de transcription TAF6 est importante pour la survie ou l'apoptose d'une cellule. Cette régulation peut intervenir autant au niveau des éléments *cis*, de courtes séquences ARN qui influencent l'épissage, qu'au niveau des facteurs *trans*, les protéines liant les éléments *cis*. Nous avons donc établi deux grands objectifs pour cette étude, soit **1) la détermination des éléments *cis* influençant l'épissage alternatif de TAF6** et **2) l'identification des facteurs *trans* liant les éléments *cis* trouvés.**

De plus, bien que TAF6 $\delta$  ait été découvert suite au traitement à l'acide rétinoïque de cellules HL-60, le signal d'épissage apoptotique entraînant la production de TAF6 $\delta$  n'est pas connu. Des analyses de micropuces sur les ARNs messagers transcrits par TFIID contenant TAF6 $\delta$  ont permis d'identifier 6 voies de signalisation activées par TAF6 $\delta$ , soient les voies de Notch, de l'angiogénèse, de la

réponse au stress oxydatif, de l'apoptose, de p53 et des intégrines. Plusieurs hypothèses ont découlé de cette étude, car plusieurs gènes sont impliqués dans ces voies et d'autres voies connectent les 6 voies activées par TAF6δ. Ainsi, un autre objectif a été établi, soit **3) la détermination du signal provoquant l'épissage alternatif de TAF6δ.**

Il a été démontré que l'expression du co-facteur de transcription TAF6 est augmentée dans les cancers du sein inflammatoires (DRESSMAN, H.K. et al, 2006). Les éléments *Alu* sont souvent associés à des maladies dues au fait qu'ils introduisent des sites d'épissage alternatif et des codons Stop, ce qui arrête la transcription de façon prématurée (LEV-MAOR, G. et al, 2003 et MAKALOWSKI, W. et al, 1994). Une étude a démontré la présence d'un élément répétitif *Alu* dans la partie du 5' du gène de TAF6. La présence de cet ARN messenger est sept fois plus élevée que TAF6 dans les cellules tumorales mammaires que dans ces mêmes cellules mammaires normales (WANG, W. et al, 2004). Il serait donc important de définir la séquence de ces éléments répétitifs dans des lignées cancéreuses et de pouvoir la comparer à la séquence de TAF6 dans des tissus normaux, ce qui pourrait éventuellement mener à l'identification de mutations qui entraîneraient une dérégulation de l'expression de l'ARN messenger de TAF6 dans les cancers. Ainsi, nous allons tenter de **4) déterminer l'importance de l'élément répétitif *Alu* dans l'ARN messenger de TAF6 exprimé dans les cellules cancéreuses mammaires.**

## **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### *Lignées cellulaires*

Les cellules HeLa ws ont été maintenues en culture dans le milieu complet DMEM + 2.5% SVF et 2.5% SVN (Wisent) et cultivées à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Les cellules PC3 ont été maintenues en culture dans du milieu HAM'S F-12 + 10% SVF (Wisent) à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>.

### *Liste des oligonucléotides*

Les séquences des différents oligonucléotides utilisés dans ces expériences sont présentées dans le tableau qui suit, des numéros ont été attribués aux oligonucléotides afin de faciliter la lecture.

**Tableau 1. Liste des séquences des oligonucléotides utilisés**

Numéro	Nom	Séquence de l'oligonucléotide	Température d'hybridation
1	T6-1B	AAA AAG GGA TCC CAT GGG CAT CGC CCA GAT TCA GG	68,1
2	T6-2E	AAA AAG GAA TTC CAA GGC GTA GTC AAT GTC ACT GG	62,9
3	T6Cko(+)	TCG CAC AGG TGA AAA GGA AAT TCT GTC CAG C	63,7
4	T6Cko(-)	GCT GGA CAG AAT TTC CTT TTC ACC TGT GCG A	63,7
5	T6C-T(+)	CAT TGG GTC CAT GTT ACC CAG GGC CC	65,3
6	T6C-T(-)	GGG CCC TGG GTA ACA TGG ACC CAA TG	65,3
7	T6Kpnl(+)	TTG GTA CCA AAA AGA GAT CGC ACA GGT GAC	61,9
8	T6Kpnl(-)	TTG GTA CCA ACT GAC CTC ATC CGT TAG CAG	62,8
9	T63'ko(+)	GCG ACT GCA TCA CAG GTG ACC CGG CCC TTC	70,1
10	T63'ko(-)	ATG CAG TCG CGA TGC GGT AGC TGA CCT CAT CCG	69,4
11	T6A-C(+)	CTA CCG CAT CAC AGA GAT CGC ACA GG	62,6
12	T6A-C(-)	CCT GTG CGA TCT CTG TGA TGC GGT AG	62,6
13	T6A-G(+)	AAA GAG GTC GCA CAG GTG ACC CGG	65,1
14	T6A-G(-)	CCG GGT CAC CTG TGC GAC CTC TTT	65,1
15	T6A-T(+)	AAA GAG TTC GCA CAG GTG ACC CGG	63,3
16	T6A-T(-)	CCG GGT CAC CTG TGC GAA CTC TTT	63,3
17	T6A-C(+)	AAA GAG CTC GCA CAG GTG ACC CGG	65,2
18	T6A-C(-)	CCG GGT CAC CTG TGC GAG CTC TTT	65,2
19	T6 3'neg(+)	GCT ACC GCA TCC ACA GGT GAC CCG G	67,1
20	T6 3'neg(-)	CCG GGT CAC CTG TGG ATG CGG TAG C	67,1
21	T6C-G(+)	CAC AGG TGA GCC GGC CCT TCT GTC CAG C	69,4



22	T6C-G ( - )	GCT GGA CAG AAG GGC CGG CTC ACC TGT G	69,4
23	T6 5'del (+)	AAC GGA TGA GGT CAG AAA GAG ATC GCA CAG G	64,1
24	T6 5'del ( - )	CCT GTG CGA TCT CTT TCT GAC CTC ATC CGT T	64,1
25	T6G-T (+)	CGG ATG AGG TCA GCT ACC TCA TCA AAG	60,4
26	T6G-T ( - )	CTT TGA TGA GGT AGC TGA CCT CAT CCG	60,4
27	T6ko2 ( + )	CTG ATG TCT GTT CTA CAG TTG ACC CCA GGA TGC C	65,1
28	T6ko2 ( - )	GGC ATC CTG GGG TCA ACT GTA GAA CAG ACA TCA G	65,1
29	5'Cko+	CGC ACA GGT GAA AAG GCC CTT CTG TCC	65,1
30	5'Cko-	GGA CAG AAG GGC CTT TTC ACC TGT GCG	65,1
31	3'Cko+	CAC AGG TGA CCC GGA AAT TCT GTC CAG C	64,4
32	3'Cko-	GCT GGA CAG AAT TTC CGG GTC ACC TGT G	64,4
33	DRA3+	GGA TGA GGT CAG CTA CCG CTT TAA AGA GAT CGC AC	64,9
34	DRA3-	GTG CGA TCT CTT TAA AGC GGT AGC TGA CCT CAT CC	64,9
35	5'KpnI+	GAT GAG GTC AGT TGG TGC ATC AAA GAG ATC GC	63,4
36	5'KpnI-	GCG ATC TCT TTG ATG CAC CAA CTG ACC TCA TC	63,4
37	3'KpnI+	AGG TCA GCT ACC ACC AAA AAG AGA TCG CAC AGG	65,3
38	3'KpnI-	CCT GTG CGA TCT CTT TTT GGT GGT AGC TGA CCT	65,3
39	ko1_2+	CTC TAC ATT GGG TCC ATA GTG AAC AGG GCC CCG	66,6
40	ko1_2-	CGG GGC CCT GTT CAC TAT GGA CCC AAT GTA GAG	66,6
41	3_K +	GAT GAG GTC AGT TGC CGC ATC AAA GAG ATC GC	64,9
42	3_K -	GCG ATC TCT TTG ATG CGG CAA CTG ACC TCA TC	64,9
43	2_K+	GAT GAG GTC AGC TAG TGC ATC AAA GAG ATC GC	62,9
44	2_K-	GCG ATC TCT TTG ATG CAC TAG CTG ACC TCA TC	62,9
45	T6 GC+	GCA CAG GTG ATC CGG CCC TTC TGT CC	66,8
46	T6 GC-	GGA CAG AAG GGCCGG ATC ACC TGT GC	66,8
47	ex2_1+	ATG GGC ATC ATT TGA GCC TAG GAG GAG AC	63,0
48	ex2_1-	GTC TCC TCC TAG GCT CAA ATG ATG CCC AT	63,0
49	ex2_2+	GCC CAG ATT CGT TGT TGT GAC TGC CAG C	65,2
50	ex2_2-	GCT GGC AGT CAC AAC AAC GAA TCT GGG C	65,2
51	ex2_3+	AGG AGG AGA CAC TAA CTA GAC TAA CGC ATG AGG	62,5
52	ex2_3-	CCT CAT GCG TTA GTC TAG TTA GTG TCT CCT CCT	62,5
53	ex2_4+	CTG CCA GCT GAC GGA TTG TAG GTC AGC TAC	64,7
54	ex2_4-	GTA GCT GAC CTA CAA TCC GTC AGC TGG CAG	64,7
55	3K_1+	GAT GAG GTC AGT TAC CGC ATC	55,3
56	3K_1-	GAT GCG GTA ACT GAC CTC ATC	55,3
57	3K_2+	GAT GAG GTC AGC TGC CGC ATC	60,7
58	3K_2-	GAT GCG GCA GCT GAC CTC ATC	60,7
59	Nhe1+	CCC TTC TGT CGC TAG CTA CAT TGG	59,2
60	Nhe1-	CCA ATG TAG CTA GCG ACA GAA GGG	59,2
61	gaga2+	ATC AAA GAG AGA GAA CAG GTG ACC CGG	61,5
62	gaga2-	CCG GGT CAC CTG TTC TCT CTC TTT GAT	61,5
63	TACCKo2+	AGG TCA GCG CAA GCA TCA AAG AGA TCG C	64,4
64	TACCKo2-	GCG ATC TCT TTG ATG CTT GCG CTG ACC T	64,4
65	ko3+	GTT CTG TCA CCG ATT TCA GGA TGC C	59,9
66	ko3-	GGC ATC CTG AAA TCG GTG ACA GAA C	59,9
67	ko4+	ATT GGG TCC ATG TCA AAA AGG GAA AAG TCC TTA GG	62,7
68	ko4-	CCT AAG GAC TTT TCC CTT TTT GAC ATG GAC CCA AT	62,7
69	ko5+	CAC AGG TGA TAT GGC CTT TCT GTC C	61,1
70	ko5-	GGA CAG AAG GGC CAT ATC ACC TGT G	61,1



71	branch pt ko+	GAT TTT GGG CTG GTG TCT GTT CTG TCA CC	62,8
72	branch pt ko-	GGT GAC AGA ACA GAC ACC AGC CCA AAA TC	62,8
73	3'C-ko5+	ATC GCA CAG GTG ATA TGG AAA TTC TGT CC	60,3
74	3'C-ko5-	GGA CAG AAT TTC CAT ATC ACC TGT GCG AT	60,3
75	Bcl-RT1	GAA CCC ACT GCT TAC TGG CT	57,4
76	PT2	AAG CTT GCA TCG AAT CAG TAG G	55,2
77	AmpT6N+	AAT CTA GCT AGC AAG ATG GCG CCG AGC GCC	68,1
78	T6-2X	ATT CCG CTC GAG AGG CGT AGT CAA TGT CAC TGG TGG	67,9
79	T6inter2+	TAC AGT GTA GGC TCA AAG CTT GG	56,9
80	corr. Mil2-	CCA TAG CAT TTA ACA TCT TTT GGG CAT	56,3
81	corr. Mil2+	ATG CCC AAA AGA TGT TAA ATG CTA TGG	56,3
82	corr. Mil1-	CAG GCT CAG CTT TCC TTA TCT TCA T	56,9
83	T6N2+	GTT TTT CGG CCT CCC TCT TCC	58,3
84	T6inter3-	GAG CCA AGA GAG GTA ACT CAC CC	58,9
85	T6mil3+	TCA AAG TGG AAG AAG GAA GGG CG	59,4
86	T6mil4-	AGG TGG GAA GAC TGC TTG GGC TT	63,0

### *Éléments cis*

#### *Obtention du minigène*

Le fragment de 249pb du gène TAF6 a été obtenu par PCR avec les oligonucléotides T6-1B et T6-2E (tableau 1, p.27-29, numéros 1 et 2), contenant les sites de restriction BamHI et EcoRI, respectivement, sur le plasmide pGEM-TAF6 (préparé par Dr Brendan Bell).

Le mélange réactionnel de la PCR contenait 50 ng de plasmide pGEM-TAF6, 1X de tampon Pfu polymérase, 0.5  $\mu$ M de T6-1B, 0.5  $\mu$ M de T6-2E, 400  $\mu$ M de dNTPs et 1.25 U de Pfu polymérase. La réaction PCR a été effectuée de la manière suivante : dénaturation initiale à 95°C pendant 3 minutes, suivie d'une dénaturation cyclique à 94°C pendant 1 minute, hybridation des oligonucléotides à la séquence matrice à 58°C pendant 45 secondes, élongation à 68°C pendant 50 secondes. Les étapes de dénaturation cyclique, hybridation et élongation ont été répétées 25 fois et une élongation finale à 68°C pendant 5 minutes a été effectuée et la réaction est



conservée à 10°C pour un temps indéterminé. Le fragment TAF6 a été purifié sur gel d'agarose 1% et, par la suite, a été ligué dans le vecteur de transfert, pTZ57R/T (Fermentas), pendant environ 16h.

#### *Transformation dans des bactéries chimio-compétentes*

Les 10 µL de réaction de ligation ont été mis en présence de 20µL de KCM 5X (KCl 0.5 M, CaCl<sub>2</sub> 0.15 M et MgCl<sub>2</sub> 0.25 M) et de 70µL d'eau et incubé 10 minutes sur glace. Cent microlitre de bactéries chimio-compétentes, *E. coli* DH5α, ont été ajoutés et le tout a été incubé 20 minutes sur glace, suivi par une incubation de 10 minutes à température pièce. Puis, 1 mL de milieu de culture LB (Bioshop), a été ajouté et la réaction de transformation a été incubée 30 minutes à 37°C avec agitation. Suite à cette incubation, la réaction de transformation a été centrifugée à 1500 x g pendant 3 minutes. La totalité des bactéries transformées a été étalée sur une boîte de pétri LB agar contenant 100 µg/mL d'ampicilline. Par la suite, le pétri a été incubé à 37°C pour la nuit.

#### *Mini-préparation d'ADN plasmidique*

Des colonies isolées ont été piquées et inoculées dans 2 mL de milieu LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline et incubé à 37°C avec agitation pour la nuit. Les cellules ont, ensuite, été centrifugées à 13 000 x g. Elles ont été resuspendues dans 100 µL de solution 1 (Tris base 25 mM, EDTA 10 mM). Deux cents microlitre de solution 2 (NaOH 0.2 M, SDS 1%) ont été ajoutés afin de lyser les bactéries et les lysats ont été incubés sur glace pour 5 minutes. Puis, 150 µL de solution 3 (CH<sub>3</sub>COOK 3 M, CH<sub>3</sub>COOH) sont ajoutés aux lysats afin de neutraliser la solution 2,

suivie d'une autre incubation sur glace pendant 5 minutes. Les lysats ont ensuite été centrifugés à 13 000 x g pendant 5 minutes pour retirer les débris bactériens. Une extraction phénol-chloroforme (phénol 50%, chloroforme 49%, alcool isoamylique 1%) a ensuite été faite afin de récupérer l'ADN du surnageant des lysats bactériens. La phase aqueuse a été récoltée et l'ADN plasmidique a été précipité par 1 mL d'éthanol 100% froid pendant 10 minutes à -20°C. L'ADN plasmidique a ensuite été culotté par une centrifugation de 10 minutes à 13 000 x g. Le culot obtenu a été lavé avec 1 mL d'éthanol 70% froid, séché à l'air ambiant et resuspendu dans 30 µL de T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (Tris base 10 mM, EDTA 1 mM) auquel a été ajouté 10 µg/mL de RNase A (Roche) et l'ARN contaminant a été digéré à 37°C pendant 10 minutes. Les mini-préparations ont été séquencées par la plate-forme de séquençage du Centre d'Innovation Université McGill Génome Québec.

#### *Transfert du fragment TAF6 dans le plasmide d'expression, pcDNA3.1+*

Quinze microlitre d'une mini-préparation contenant le fragment de 249pb de TAF6, ainsi que 2.5 µg du plasmide d'expression mammifère, pcDNA3.1+, ont été digérés par les enzymes de restriction BamHI et EcoRI (New England Biolabs). Les réactions de digestion ont été migrées sur gel d'agarose 1% et les fragments du plasmide pcDNA3.1+ ouvert et de TAF6 ont été extraits de l'agarose selon un protocole de trousse (QIAquick gel extraction kit, Qiagen). Par la suite, une réaction de ligation a été menée pendant 16h à 16°C en utilisant une proportion de 10 volumes d'inserts TAF6 pour 1 volume de plasmide pcDNA3.1+ ouvert et la ligation a été transformée dans les bactéries chimio-compétentes, DH5α.

### *Mutagenèse par PCR du minigène TAF6*

Une paire d'oligonucléotides complémentaires a été conçue pour chaque mutation désirée et les séquences de ces oligonucléotides sont présentées dans le tableau 1, p. 27-29 (numéros 3 à 74, par paire, par exemple, numéro 3 (T6Cko(+)) et 4 (T6Cko(-)).

Cent nanogramme du plasmide de base (pcDNA3.1+ TAF6) ont été mélangés avec 1 X de tampon Pfu DNA polymerase, 200 µM de chaque dNTPs (GE Healthcare), 400 nM de chaque oligonucléotide, et 2.5 U de Pfu DNA polymérase. La réaction PCR a été effectuée de la manière suivante : dénaturation initiale du plasmide a été faite à 94°C pendant 3 minutes, suivie d'une dénaturation cyclique à 95°C de 30 secondes, l'hybridation des oligonucléotides devait se faire pendant 1 minute à une température inférieure de 5 à 6°C aux 72°C de l'élongation qui lui faisait suite pour une durée de 6 minutes. Les étapes de dénaturation cyclique, d'hybridation et d'élongation ont été faites 12 fois. Une dernière phase d'élongation à 72°C a été faite après les 12 cycles pendant 5 minutes. La réaction PCR a été, ensuite, digérée par l'enzyme de restriction DpnI (New England Biolabs) qui cible les régions méthylées et digère ainsi le plasmide matrice, mais pas les plasmides nouvellement synthétisés par PCR. Une partie de la réaction PCR a été migrée sur gel d'agarose 1% afin de visualiser le mutant. Cinq microlitre de la réaction a, par la suite, été transformées dans les bactéries chimio-compétentes, *E. coli* XL<sub>1</sub>bleu. Des mini-préparations d'ADN plasmidique des mutants ont été préparées et séquencées à la plate-forme de séquençage du Centre d'Innovation Université McGill Génome Québec.

### *Transfection des HeLa ws par le plasmide pcDNA3.1+ TAF6 ou ses mutants*

La veille de la transfection, les cellules HeLa ws ont été réparties dans une plaque 24 puits, à raison de 80 000 cellules par puit dans 500  $\mu$ L de milieu HeLa complet et ont été cultivées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> pour la nuit. Le jour de la transfection, le milieu des puits a été remplacé par 300  $\mu$ L d'opti-MEM (Wisent) et incubé à nouveau à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Un microlitre de DMRIE-C (Invitrogen) a été mélangé à 150  $\mu$ L d'opti-MEM et incubé seul pendant 30 minutes à température pièce. Deux cents cinquante microgramme de plasmide a été mélangé à 150  $\mu$ L d'opti-MEM. Après l'incubation du DMRIE-C, 150  $\mu$ L a été mélangé à 150  $\mu$ L de préparation plasmidique et incubé à température pièce pendant 15 minutes afin de permettre la formation de complexe ADN-DMRIE-C. L'opti-MEM des puits de HeLa a été remplacé par 300  $\mu$ L de mélange DMRIE-C et ADN plasmidique. La plaque a été incubée pour 24h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, après lesquelles le milieu a été changé pour du milieu HeLa ws complet et la culture s'est poursuivie pour 18h supplémentaires à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### *Extraction d'ARN*

Le milieu a été retiré de la plaque de HeLa ws transfectées et 250  $\mu$ L de Trizol (GibcoBRL) ont été ajoutés dans chaque puit afin de briser la membrane cellulaire ainsi que les organelles de la cellule tout en maintenant l'intégrité de l'ARN. Cinquante microlitre de chloroforme ont été ajoutés aux 250  $\mu$ L de Trizol récoltés des puits et le tout a été agité vigoureusement et incubé 2 minutes à température pièce. Une première centrifugation a été effectuée à 13 000 x g pendant 15 minutes, afin de séparer l'ARN, présent dans la phase aqueuse, de l'ADN, et des protéines, situées

dans la phase organique et l'interphase. Cent cinquante microlitre de la phase aqueuse ont été prélevés et mis en présence de 125  $\mu$ L d'isopropanol (Fisher). Le tout a été inversé afin de mélanger l'isopropanol avec la phase aqueuse et l'ARN a été précipité à température pièce pendant 2 minutes. Une deuxième centrifugation a été effectuée à 13 000 x g pendant 15 minutes afin de culotter l'ARN. Le surnageant a été aspiré et 1 mL d'éthanol 75% a été ajouté et le tout a été vortexé afin de laver le culot d'ARN. La dernière centrifugation a été effectuée à 8 000 x g pendant 5 minutes. Le surnageant a été complètement enlevé et le culot a été séché à l'air ambiant avant d'être resuspendu dans un volume de 5  $\mu$ L d'eau nano stérile, digéré à la DNase A (Promega) pendant 30 minutes à 37°C afin d'éliminer l'ADN contaminant et a été dosé à 260nm au spectrophotomètre.

#### *Transcription inverse (RT)*

Un microgramme d'ARN extrait a été dilué dans un volume total de 10  $\mu$ L contenant de l'eau nano stérile, du tampon RQ1 RNase-free DNase 1X a été ajouté ainsi que 1 U de RQ1 RNase-free DNase (Promega). L'ADN contaminant a été digéré à 37°C pendant 30 minutes et, par la suite, la réaction a été arrêtée en ajoutant 1X de la solution STOP. La DNase A a été dénaturée à 65°C pendant 10 minutes. Deux microlitre d'oligonucléotide RT3-PT2 (IDT) (AAG CTT GCA TCG AAT CAG TAG GGA AGG CAC AGT CGA GGC TG) à 20  $\mu$ M ont été ajoutés à la réaction et les tubes ont été placés à 94°C pendant 2 minutes afin de dénaturer l'ARN pour permettre l'hybridation de l'oligonucléotide en 3' de l'insert de TAF6 (sur le plasmide pcDNA3.1+) et, par la suite, les tubes ont été mis immédiatement sur la glace pour empêcher la renaturation de l'ARN. Huit microlitre d'un mélange de transcription

inverse (tampon AMV RT 1X, 1 mM de mélange dNTPs, 5  $\mu$ M de DTT et environ 14 U de MMuLV Reverse Transcriptase (préparée par Catherine Desrosiers)) a été ajouté à la réaction sur glace. La transcription inverse a été menée à 42°C pendant 1 heure.

#### *Réaction en chaîne par polymérase (PCR) non-radioactif et radioactif*

Deux microlitre d'ADN complémentaire obtenu suite à la RT ont été mélangé à 1X de tampon Taq DNA polymérase, 400  $\mu$ M de chacun des dNTPs, 400 nM de chaque oligonucléotides Bcl-RT1 et PT2 (voir tableau 1, p.27-29, numéros 75 et 76) à 20  $\mu$ M et 0.63 U de Taq DNA polymérase (préparée par Catherine Desrosiers).

La réaction PCR a été effectuée de la manière suivante pour 44 des 55 mutants : dénaturation initiale, 3 minutes à 94°C, dénaturation cyclique à 94°C pour 1 minute, hybridation à 58°C pour 45 secondes, élongation à 68°C pour 50 secondes et les étapes de dénaturation cyclique, hybridation et élongation ont été répétées 25 fois et la dernière élongation se fait à 68°C pour 5 minutes. Les 11 derniers mutants ont été amplifiés par PCR radioactive. La réaction PCR et le mélange réactionnel sont demeurés essentiellement les mêmes à l'exception de la quantité du mélange de dNTPs (200  $\mu$ M au lieu de 400  $\mu$ M) et ajout de 0.1  $\mu$ L (0.37MBq) de dCTP [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] (PerkinElmer).

#### *Gel 15% non-dénaturant*

Quatre microlitre de la réaction PCR ont été migré sur gel de polyacrylamide 15% non-dénaturant (15% d'acrylamide (30) : bis-acrylamide (0.8) et TBE 1X) à 150V pendant environ 1 heure 30 minutes dans du TBE 1X (Tris base 0,09 M, EDTA 0,1 M et acide borique 0,089 M). Le gel a été coloré au bromure d'éthidium et une

photographie aux UV a été prise. Les gels pour les PCRs radioactives ont la même concentration en acrylamide : bis-acrylamide (30 : 0,8), la migration a aussi été effectuée à 150V, mais pendant 18 heures. Le gel avec les PCRs radioactives a été séché à 80°C pendant 45 minutes et exposé 8 heures sur un écran PhosphoScreen et révélé à l'aide du Storm (Amersham).

### *Quantification des PCRs*

La quantification des PCRs non-radioactives s'est faite selon le protocole d'électrophorèse en capillaire pour ADN du BioAnalyser 2100 (Agilent). La quantification des PCRs radioactives a été faite à l'aide du logiciel ImageQuant à partir de l'image obtenue par la révélation au Storm.

### *Facteurs trans*

#### *Amplification des échantillons d'ADNc du Laboratoire de Génomique Fonctionnelle de l'Université de Sherbrooke (LGFUS)*

L'amplification par PCR radioactive des ADNc de cellules transfectées par des siRNA ciblant différentes protéines de liaison à l'ARN a été faite comme décrit ci-dessus pour les PCRs non-radioactives et radioactives des mutants. La PCR radioactive a été faite sur 33 cycles au lieu de 25. La PCR non-radioactive a été menée sur 35 cycles au lieu de 25. De plus, les oligonucléotides utilisés pour ces ADNc sont T6-1B et T6-2E (voir tableau 1, p. 27-29, numéros 1 et 2) Le gel 15% de migration est aussi le même. La quantification a été faite par le logiciel ImageQuant.

### *Transfection d'un siRNA contre hnRNP K dans les cellules PC3*

La veille de la transfection, les cellules PC3 ont été réparties à raison de 80 000 cellules par puits dans une plaque 24 puits et cultivées à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Le jour de la transfection, le milieu des puits a été remplacé par 350 µL d'opti-MEM. Puis, 0.7 µL de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) a été incubé à température pièce dans 50 µL d'opti-MEM pendant 5 minutes pour chacune des réactions de transfection. Ensuite, 50 µL de Lipofectamine a été ajouté sur chaque dilution de siRNA contrôle ou contre hnRNP K (IDT) à 100 nM dans 50 µL d'opti-MEM et incubé à température pièce pendant 20 minutes pour permettre la formation de complexe Lipofectamine-siRNA. Chaque réaction a été ajoutée goutte-à-goutte dans les puits contenant les cellules dans 350 µL d'opti-MEM. La plaque a ensuite été incubée à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> pendant 72 et 96 heures. L'ARN (protocole, p. 34) et les protéines ont été extraits après l'incubation et une RT-PCR a été réalisée avec des oligonucléotides spécifiques pour TAF6 endogène (oligonucléotides, tableau 1, p.27-29, oligonucléotides numéros 1 et 2 et protocoles, p. 34-35).

### *Extraction de protéines pour immunobuvardage de type western*

La plaque a été mise sur glace et le milieu a été retiré des puits. Deux cents microlitre de PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.3 mM et KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.47 mM à pH 7.4) a été ajouté dans chaque puit et les cellules ont été récupérées par grattage. Les puits ont été rincés avec 200 µL de PBS 1X supplémentaires. Les cellules ont été récupérées par centrifugation à 13 000 x g pendant 30 secondes. Le culot a été resuspendu à la pipette dans 10 µL de RIPA (NaCl 150 mM, NP-40 1%, sodium deoxycholate 0.5%, SDS 0.1% et Tris 50 mM, pH 8.0) + PMSF 0.5 mM pour



lyser les cellules. Le lysat a été gelé dans l'azote liquide afin de briser les organelles et centrifugé à 13 000 x g pendant 15 minutes à 4°C, ce qui a permis de précipiter les débris cellulaires. Le surnageant, contenant les protéines, a été récupéré et du Laemmli 1X (Tris-HCl 0.25 M, pH 6.8, glycérol 5%, SDS 1%,  $\beta$ -mercaptoéthanol 2.5% et bleu de bromophénol 0.025%) a été ajouté. L'échantillon a été bouilli pendant au moins 5 minutes pour dénaturer les protéines.

#### *Immunobuvardage de type western pour hnRNP K*

Un gel de 12% a été coulé (Résolution : Tris 0.38 M, pH 8.8, SDS 0.1% et acrylamide : bisacrylamide (30 : 0.8) 12%; Concentration : Tris 0.13M, pH 6.8, SDS 0.1% et acrylamide : bisacrylamide (30 : 0.8) 4%). La moitié du volume a été migré sur ce gel dans du tampon de migration (Tris base 0.025 M, glycine 0.192 M et SDS 0.1%) à 150V. Par la suite, le transfert des protéines du gel de 12% sur une membrane de nitrocellulose a été effectué dans du tampon de transfert (Tris base 0.01 M, glycine 0.077 M et éthanol 20%) à 115V pendant 1 heure. Tous les sites non-spécifiques sur la membrane ont été bloqués avec du lait en poudre 5% dans du PBS 1X + Tween-20 0,05% pendant au moins 1 heure. Ensuite, le premier anticorps anti-hnRNP K (gracieuseté du laboratoire de Dr Benoit Chabot) a été ajouté dans du PBS + Tween-20 0.05% + lait 0.5% à une dilution de 1/1000 et incubé sur la membrane pendant 1 heure à température pièce afin de permettre la liaison aux épitopes de hnRNP K fixée sur la membrane de nitrocellulose. La membrane a été lavée trois fois dans du PBS + Tween-20 0.05% pendant 5 minutes. Puis, l'anticorps secondaire GAMPO (goat anti-mouse peroxydase, BioCan scientific Inc.) a été ajouté dans du PBS + Tween-20 0.05% + lait 0.5% à une dilution de 1/5000 et incubé pendant 1 heure à température

pièce afin de permettre sa liaison sur la portion espèce-spécifique de l'anticorps primaire. 3 nouveaux lavages identiques aux premiers ont été faits. Par la suite, le substrat de la peroxydase (ECL Plus, Amersham) a été ajouté pendant 5 minutes sur la membrane afin de permettre à l'enzyme liée à l'anticorps secondaire de générer le produit fluorescent. La fluorescence a été détectée et mesurée au Storm 860 (Amersham).

#### *Transcrit d'ARN radiomarqué du minigène*

Le minigène a été linéarisé par digestion avec l'enzyme de restriction XhoI (New England Biolabs) et purifié sur gel d'agarose 1%. La réaction de transcription est composée de tampon de transcription 1X (Fermentas), 0.5 mM de chaque rNTPs (A : U : G) (GE Healthcare), 12  $\mu$ M de 5-bromocytidine-5'-triphosphate (TriLink), 20 U de RNA guard (Amersham), 20 U de T7 RNA polymérase (Fermentas), 2.5  $\mu$ L de CTP [ $\alpha$ -32P] (PerkinElmer) et 1  $\mu$ g de pcDNA3.1+ TAF6 linéarisé. La transcription a été effectuée à 37°C pendant 1 heure. À la fin de la transcription, 10  $\mu$ L de tampon de charge au formamide (10 mM EDTA, formamide 10%, 10 mg xylène cyanol et 10 mg bleu de bromophénol) ont été ajoutés et le tout a été migré sur gel 5% dénaturant (urée 8 M, TBE 1X et acrylamide (32) : bisacrylamide (2) 5%) pendant 1 heure à 350V avec refroidissement. Le gel a ensuite été exposé 30 secondes sur un film (Kodak) et celui-ci a été développé. En superposant le film et le gel, il a été possible de découper la bande correspondant au transcrit. Puis, la bande a été écrasée jusqu'à ce qu'elle ait une apparence visqueuse. Trois cents microlitre de solution d'extraction NaOAc-SDS (NaOAc 0.3 M et SDS 0.2%) ont été ajoutés. L'ARN transcrit a été extrait à température pièce pendant 20 minutes avec rotation. Puis, il a été centrifugé

à 13 000 x g pendant 5 minutes à température pièce et le surnageant contenant l'ARN transcrit a été conservé. Deux cents microlitre de solution NaOAc-SDS ont été rajoutés au culot de gel broyé pour une seconde extraction de 10 minutes avec rotation. La bande a été centrifugée à 13 000 x g pendant 5 minutes. Le surnageant contenant l'ARN transcrit a été récupéré et a été mis avec celui récupéré plus tôt. Cinq cents microlitre de phénol-chloroforme (phénol 50%, chloroforme 49% et alcool isoamylique 1%) ont été ajoutés et, par la suite, vortexé 15 secondes afin de purifier l'ARN transcrit. La réaction a été centrifugée 2 minutes à 13 000 x g afin de séparer l'ARN transcrit des contaminants. Une deuxième extraction phénol-chloroforme a été faite. Puis, à la phase aqueuse qui contient l'ARN transcrit, a été ajouté 1 mL d'éthanol 100% et mélangé par inversion. Ensuite, l'ARN transcrit a été précipité à -80°C pendant 30 minutes. Puis, une centrifugation de 20 minutes à 13 000 x g a permis de culotter l'ARN. L'éthanol a été retiré et le culot d'ARN a été dosé en mesurant la quantité de radioactivité incorporée dans ce transcrit. L'ARN a été resuspendu dans un volume d'eau nano stérile afin d'obtenir 50 000 cpm/ $\mu$ L.

#### *Pontage aux ultraviolets (UV crosslink)*

La réaction contenait 0.5 mM de rATP, 3.2 mM de  $MgCl_2$ , 2 mM de DTT, 2.5% de PVA, 5  $\mu$ L d'extrait nucléaire de cellules HeLa ws et 1  $\mu$ L d'ARN transcrit radiomarké à 50 000 cpm/ $\mu$ L. Le mélange a été incubé pendant 10 minutes à 30°C pour permettre la liaison spécifique de certaines protéines de l'extrait nucléaire au transcrit d'ARN radiomarké. Ensuite, la réaction a été répartie sur un Saran afin d'effectuer le pontage aux ultraviolets dans le StrataLinker (Stratagène) à 5000 X 100 $\mu$ J. Par la suite, les ARN liés aux protéines ont été récupérés et 2  $\mu$ L de RNase A

(USB) ont été ajoutés et l'ARN non-lié a été digéré pendant 30 minutes à 37°C. Du Laemmli 1X a été ajouté aux réactions de pontage et les échantillons ont été bouillis afin de dénaturer les protéines puis déposés sur un gel de polyacrylamide non-dénaturant 10%. Le gel a été migré pendant 18 heures à 75V. Le gel a été séché à 80°C pendant 45 minutes et a été exposé au moins 8 heures sur un écran PhosphoScreen. Par la suite, l'écran PhosphoScreen a été développé au Storm.

#### *Immunoprécipitation couplée au pontage aux UVs*

Trente-cinq microlitre de billes protéine A (GE Healthcare) ont été lavées deux fois avec 1 mL d'eau nano stérile. Puis, elles ont été lavées une fois avec 1 mL de tampon IP100 (Tris 25 mM, pH 8.0, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, glycérol 10%, KCl 100 mM, NP-40 0.1% et DTT 0.3 mM). Les billes ont été resuspendues à 50% dans 35 µL de tampon IP100. Un microlitre d'anti-hnRNP K ou 1.5 µL d'anti-ARNT (SC17811, SantaCruz) ont été ajoutés aux billes et le volume a été ajusté à 200 µL afin de permettre un maximum d'interaction entre les billes protéine A et les anticorps. Les billes ont été liées aux anticorps pendant 1 heure à température pièce avec rotation. Puis, elles ont été lavées deux fois avec IP500 (Tris 25 mM, pH 8.0, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, glycérol 10%, KCl 500 mM, NP-40 0.1% et DTT 0.3 mM), deux fois avec IP100 et une fois avec tampon A (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, NaCl 100 mM et MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM) + Triton X-100 0.1%. Le pontage a été effectué (voir protocole précédent, p. 41) pendant la liaison des billes avec les anticorps. Par la suite, la réaction de pontage a été mélangée à des billes protéine A sans anticorps avec rotation pendant au moins 1 heure à 4°C afin de diminuer les interactions non-spécifiques. Puis, les billes avec la réaction de pontage ont été centrifugées à 2000 x g pendant 2 minutes et le surnageant

(*input*) a été récupéré. L'immunoprécipitation a été effectuée avec 30  $\mu$ L d'*input* et 20  $\mu$ L de billes protéine A avec ou sans anticorps à 4°C pendant 2 heures avec rotation. Les immunoprécipitations ont été centrifugées à 2000 x g pendant 2 minutes et les surnageants (SNIP) ont été conservés. Puis, les billes ont été lavées quatre fois avec le tampon A 500 (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, NaCl 500 mM et  $MgCl_2$  2.5 mM) + Triton X-100 0.1%. Les billes ont été, par la suite, lavées deux fois avec le tampon A + Triton X-100 0.1%. Du Laemmli 1X a été ajouté à chacune des réactions et les réactions ont été bouillies au moins 5 minutes afin de dénaturer les complexes protéines-ARN immunoprécipités. Dix pour cent de l'*input* et la totalité des surnageants de l'immunoprécipitation et des immunoprécipitats ont été déposés sur gel non-dénaturant 10% ou sur un gel dénaturant 15% pour immunobuvardage de type western (voir protocole pour l'immunobuvardage de type western, p.38). Le gel non-dénaturant a été migré à 75V pendant 18 heures dans du TBE 1X. Puis, il a été séché à 80°C pendant 45 minutes et développé au Storm 860 afin de visualiser l'ARN lié à hnRNP K.

#### *Immunoprécipitation in vivo*

Trois millions de cellules HeLa ws et PC3 ont été réparties sur un pétri de diamètre de 10 cm deux jours avant l'immunoprécipitation et cultivées à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Cent microlitre de billes protéine A (50%) et billes protéine G (50%) ont été lavées deux fois avec de l'eau nano stérile, puis, une fois avec du tampon IP (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 1%, NP-40 0.5%, DTT 0.5 mM, PMSF 0.5 mM, PIC 1X, NaF 10  $\mu$ M et 120 U RNA guard (Amersham)). Les billes ont été resuspendues à 50% dans le tampon IP. Les cellules ont été grattées

avec 1 mL de PBS 1X froid et les pétris ont été rincés par 500  $\mu$ L de PBS 1X froid, puis centrifugées à 10 000 x g pendant 30 secondes afin de récupérer les cellules. Les cellules ont été lysées dans 100  $\mu$ L de tampon IP. Le surnageant a été purifié par 150  $\mu$ L de billes à 50% pendant au moins 1 heure 30 minutes à 4°C avec rotation afin de diminuer les interactions non-spécifiques avec les billes liées aux anticorps. Le surnageant a été gardé pour l'immunoprécipitation (*input*). Dix microlitre de l'*input* (10%), qui ne seront pas immunoprécipités ont été conservés pour pouvoir estimer l'enrichissement de l'ARN d'intérêt lors de l'IP, par rapport à ce qui a été initialement mis dans la réaction. Pendant la purification de l'extrait cellulaire, 80  $\mu$ L de billes à 50% ont été liées à 3  $\mu$ L d'anticorps contre hnRNP K, ou 4.5  $\mu$ L d'anticorps contre ARNT, ou seules pendant au moins 1 heure à température pièce avec rotation. Puis, elles ont été lavées deux fois avec 500  $\mu$ L de tampon IP500, deux fois avec 500  $\mu$ L de tampon IP100 et une fois avec 500  $\mu$ L de tampon IP. Les billes ont été resuspendues à 50% dans le tampon IP. Ensuite, 100  $\mu$ L d'*input* ont été immunoprécipités avec 80  $\mu$ L de billes à 50% avec ou sans anticorps pendant 2 heures à 4°C avec rotation. Les immunoprécipitations ont été centrifugées à 2 000 x g pendant 2 minutes à 4°C et les surnageants ont été conservés (SNIP). En travaillant à 4°C, les billes ont été lavées une première fois avec 500  $\mu$ L de tampon IP avec moitié moins de détergents (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 0.5%, NP-40 0.25%, DTT 0.5 mM, PMSF 0.5 mM, PIC 1X, NaF 10  $\mu$ M et 120 U RNA guard). Les billes ont été lavées trois fois avec 500  $\mu$ L de tampon de ligation 175 – inhibiteurs (Tris-HCl 5 mM, NaCl 175 mM, EDTA 1 mM et NP-40 0.05%). Puis, les billes ont été lavées une dernière fois avec 500  $\mu$ L de tampon de ligation 25 (Tris-HCl 5 mM, NaCl 25 mM, EDTA 1 mM et NP-40 0.05%). Deux cents microlitre de tampon d'élution

(NaCl 100 mM et SDS 1%) ont été ajoutés à chaque 80 µL de billes et l'ARN lié aux protéines immunoprécipitées ainsi qu'aux 10 µL d'input conservés avant IP et qu'aux SNIPs. L'élution a été menée à 65°C pendant 10 minutes. Puis, 500 µL de phénol-chloroforme ont été ajoutés et les réactions ont été vortexées pendant 15 secondes afin de purifier l'ARN. Les réactions ont été centrifugées à 13 000 x g pendant 2 minutes à 4°C. La phase aqueuse contenant l'ARN a été récupérée et 1 mL d'éthanol 100% a été ajouté pour précipiter l'ARN à -80°C pendant 30 minutes. Une centrifugation à 13 000 x g pendant 20 minutes à 4°C a permis de culotter l'ARN. L'ARN a été resuspendu dans 10 µL d'eau nano stérile pour les réactions d'immunoprécipitation (IP) et dans 15 µL d'eau nano stérile pour les échantillons d'*input* et des SNIPs. La totalité de l'ARN récupéré des IP et 1 µL des *input* et des SNIP ont été digérés à la DNase A pendant 30 minutes à 37°C afin d'éliminer l'ADN contaminant et une transcription inverse a été réalisée avec l'amorce oligodT à 20 µM (GE Healthcare) (voir protocole de RT, page 33). Puis, une PCR avec les oligonucléotides spécifiques à TAF6 endogène (T6-1B et T6-2E, tableau 1, p.27-29, numéros 1 et 2) à 20 µM a été effectuée (voir protocole PCR radioactive et gel 15% non-dénaturant p.35-36).

#### *Immunoprécipitation in vivo avec pontage au formaldéhyde (ChIP ARN)*

Trois millions de cellules HeLa ws ont été réparties dans un pétri de diamètre de 10 cm et cultivées à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>, deux jours avant le ChIP ARN. Tout d'abord, 120 µL de billes protéine A compactes ont été utilisées. Les billes ont été lavées deux fois avec 1 mL d'eau nano stérile, puis une fois avec 1mL de RIPA + inhibiteurs (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP-40 1%, sodium deoxycholate 0.5%, SDS 0.05%, PIC 1X et 50 U RNA guard). Par la suite, les billes

ont été resuspendues à 50% dans le RIPA + inhibiteurs. Les cellules ont été lavées avec 10 mL de PBS 1X et 10 mL de PBS 1X + 1% formaldéhyde (Fisher) ont été ajoutés afin de lier de façon covalente les protéines sur l'ARN pendant 10 minutes à température pièce. Deux millilitre de glycine 1.25 M ont été ajoutés et la réaction de pontage a été arrêtée pendant 5 minutes à température pièce. Les cellules ont été déposées sur glace et lavées deux fois de plus avec 10 mL de PBS 1X froid. Le pétri a été gratté deux fois sur glace avec 500 µL de PBS 1X froid. Puis, les cellules ont été récupérées par centrifugation à 4 000 x g pendant 4 minutes à 4°C. Les cellules ont été lysées dans 400 µL de RIPA avec inhibiteurs. Puis, les lysats cellulaires ont été soniqués sur glace 18 fois 10 secondes avec 20 secondes de pause entre chaque sonication pour briser les organelles des cellules. Les lysats ont, par la suite, été centrifugés à 13 000 x g pendant 15 minutes à 4°C afin de culotter les débris cellulaires. Les surnageants ont été réunis et purifiés avec 300 µL de billes à 50% ainsi que 0.1 mg/mL de ARNt de levure et 0.45 d'anticorps contre tubuline (anticorps de souris, Sigma-Aldrich) pendant 2 heures à 4°C avec rotation afin de diminuer les interactions non-spécifiques. Puis, la réaction de purification a été centrifugée à 2 000 x g pendant 2 minutes à 4°C. Le surnageant (*input*) a été récupéré. Pendant la purification de l'extrait cellulaire, 80 µL de billes à 50% ont été liés à 3 µL d'anticorps contre hnRNP K, ou à 4.5 µL d'anticorps contre ARNT, ou seules pendant 1 heure avec rotation. Les billes ont été lavées deux fois avec 500 µL d'IP500, deux fois avec IP100 et une fois avec RIPA sans inhibiteurs (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP-40 1%, Na deoxycholate 0.5% et SDS 0.05%). Les billes ont été resuspendues à 50% dans le RIPA avec inhibiteurs. Ensuite, 400 µL d'*input* ont été immunoprécipités avec 80 µL de billes à 50% pendant environ 18



heures à 4°C avec rotation. Les réactions d'immunoprécipitation ont été centrifugées à 2 000 x g pendant 2 minutes à 4°C et le surnageant (SNIP) a été conservé. Les billes ont été lavées six fois avec 500 µL de RIPA auquel a été rajouté 500 mM de NaCl et 1 M d'urée. Les billes ont été resuspendues dans 100 µL de tampon d'élution (Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM et DTT 10 mM) afin de récupérer les complexes ARN-protéines liés aux anticorps. Par la suite, le pontage au formaldéhyde a été renversé en incubant les billes dans le tampon d'élution à 70°C pendant 45 minutes. L'extraction de l'ARN a été faite selon le protocole au Trizol avec digestion à la DNase A (voir protocole, p.33). La RT a été effectuée avec l'oligodT à 20 µM (voir protocole, p. 34). La PCR radioactive a été effectuée avec les oligonucléotides spécifiques à TAF6 endogène (T6-1B et T6-2E, voir tableau 1, p.27-29, numéros 1 et 2) à 20 µM (voir protocole PCR radioactive et gel 15% non-dénaturant, p.35-36).

### ***Signal d'épissage***

Le tableau 4 présente les différents tests qui ont été effectués sur des cellules HeLa ws.

**Tableau 2. Liste des traitements sur les cellules HeLa ws**

Traitement	Description	Concentrations ou durée des traitements	Temps d'incubation à 37°C	Compagnie
DMEM - sérum et/ou glucose	Privation de nutriments	--	30min à 6h	Wisent
DMEM + Hepes en hypoxie ou normoxie	Incubation à 37°C sans oxygène (CRC, laboratoire du Dr Claire Dubois)	0% O <sub>2</sub> et normoxie (~20%)	~18h	Wisent
Acide lactique, chlorhydrique et acétique	pH du milieu de culture	pH 5,0-5,5-6,0-6,5 et 7,0	2h	Fisher
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	Hypoxie chimique	50, 100, 500 et 1000 µM	2h	Fisher

Antimycine A	Inhibiteur de la respiration cellulaire	10, 25, 50 et 100 $\mu$ M	3h, 5h et 6h30min	Sigma
Antimycine A + hypoxie en chambre		10 $\mu$ M	~18h	
Mévastatine	Inhibiteur de la prénylation de protéines post-traductionnellement	5 et 50 $\mu$ M	42h	Sigma
Mévastatine + hypoxie en chambre		100 $\mu$ M	~18h	
CoCl <sub>2</sub>	Hypoxie chimique	100, 200 et 300 $\mu$ M	~18h	Sigma
Déferoxamine mesylate	Chélation des ions ferriques	50, 100 et 150 $\mu$ M	~18h	Sigma
Tampon hypoxique (Acide borique 200mM et Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 100mM) + hypoxie en chambre	Chélation de l'oxygène et hypoxie par incubation avec CO <sub>2</sub>	10 psi et dégazage 4 x 5min	~18h	Praxair
TGF $\beta$	Facteur de croissance	2 ng/mL	~18h	Laboratoire Dr Claire Dubois
DETA/NO	Donneur d'oxide nitrique	100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 $\mu$ M et 1 mM	22h pour les puits de 100 à 250 $\mu$ M et 5h30min pour les puits 300 $\mu$ M à 1 mM	Sigma
DETA/NO + hypoxie		100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 $\mu$ M et 1 mM	22h pour les puits de 100 à 250 $\mu$ M et 5h30min pour les puits 300 $\mu$ M à 1 mM	
Sorbitol	Choc hypo- et hyperosmotique	0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 et 0.9 M	2h	Laboratoire Dr Raymund Wellinger
Protoporphyrin IX Zinc(II)	Inhibe l'hème oxygénase et 3 isoformes de NO synthase	1, 2.5, 5, 10, 15 et 30 $\mu$ M	~18h	Sigma
Protoporphyrin IX Zinc(II) + hypoxie		1, 2.5, 5, 10, 15 et 30 $\mu$ M	20h et 48h	
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Hypoxie chimique	2 mM	14, 17, 21 et 38h	Sigma
Ré-oxygénation après hypoxie		Hypoxie 2h	20, 40, 60, 120min et 7h	

Tunicamycine	Inhibiteur de la glycosylation des protéines	0.5, 1.5 et 3 µg/mL	16h	Sigma
L-NAME	Inhibe la production de NO intracellulaire	10 µM	30h	Sigma
L-NAME + hypoxie en chambre		10 µM	30h	
Hemin	substrat de l'hème oxygénase	5, 15, 30 et 45 µM	30h	Fluka
		0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 et 10 µM	4h	
Hemin + hypoxie en chambre		5, 15, 30 et 45 µM	30h	
CORM-2	Facteur de relâche de monoxyde de carbone	12.5, 25, 50, 100, 500 µM et 1 mM	2h	Sigma
		10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 et 300 µM	4h	
CORM-2 - hypoxie en chambre		12.5, 25 et 50 µM	30h	
Transfection d'un plasmide exprimant HO-1 (hème oxygénase-1)	Hème oxygénase-1, enzyme de dégradation de l'hème	100, 150, 200, 250, 300, 400, 550, 700, 850, et 1000 ng	24h	pcDNA3,1/Zeo.o.CMV.Flag.h HO-1 (laboratoire Dr Hyman Schipper)
		150 ng	0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 6, 8, 10, 12 et 24h	
		250 ng	16, 20, 24, 32 et 36h	
		5, 30, 55, 80, 105, 130, 155, 180, 205, 230, 255 et 305 ng	24h	
HO-1 + hypoxie		250 ng	24h	
HO-1 + protoporphyrin IX Zinc(II)		250 ng de HO-1 et 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 50, 100 et 200 µM	24h	
HO-1 + hemin		250 ng de HO-1 et 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 et 1000 µM	24h	
HO-1 - déferoxamine		250 ng de HO-1 et 10, 50, 100 et 200 µM	24h	
HO-1 + CORM-2		250 ng de HO-1 et 10, 25, 50, 100, 200 et 300 µM	2, 4, 6, 8 et 24h	



HO-1 + biliverdine		250 ng de HO-1 et 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 et 100 $\mu$ M	24h	
HO-1 + hémoglobine	Hémoglobine capte le CO intracellulaire	250 ng et 10, 50, 100 et 200 $\mu$ M	24h	
Transfection d'un plasmide exprimant H25A	Mutation de HO-1 d'une histidine en position 25 pour une alanine	250 et 550 ng 150 ng	24h 2, 3 et 4h	
Transfection d'un plasmide exprimant HO-2	Hème oxygénase-2	100, 300, 500 et 700 ng	24h	Laboratoire du Dr Phillis A Dennerly
Biliverdine	Inhibe l'hème oxygénase par blocage du site de liaison du substrat sur l'enzyme	5, 20, 50 et 100 $\mu$ M	24h	MP Biomedicals
FeSO <sub>4</sub>	Donneur d'ion Fe <sup>2+</sup>	5, 20, 50 et 200 $\mu$ M	24h	Fisher
Gazage des HeLa ws au CO	Hypoxie	15min	5, 15, 30, 45, 60 et 120min	Praxair
		5, 15, 35, 45 et 50 mL	2h	
		30min	4h	
		30min et 2h	4h	
Gazage des HeLa ws au CO + hémoglobine		200 $\mu$ M d'hémoglobine et 15min de gazage	4h	
Succinyl acétone	Inhibiteur de la synthèse d'hème	0.1, 0.5, 1, 2.5 et 5 mM	~18h	Sigma
		0.1, 0.5, 1, 2.5 et 5 mM	48 et 72h	
HO-1 + succinyl acétone		250 ng de HO-1 et 2.5 mM	~18h	
Isoniazid	Inhibiteur de la synthèse d'hème	1, 5, 10, 25 et 50 mM	~18h	Sigma
		1, 5, 10, 25 et 50 mM	48 et 72h	
HO-1 + isoniazid		250 ng de HO-1 et 25 mM	~18h	
Biliverdine + FeSO <sub>4</sub>		50 $\mu$ M biliverdine et 50 $\mu$ M FeSO <sub>4</sub>	4h	
Biliverdine + CORM-2		50 $\mu$ M biliverdine et 50 $\mu$ M CORM-2	4h	
FeSO <sub>4</sub> + CORM-2		50 $\mu$ M FeSO <sub>4</sub> et 50 $\mu$ M CORM-2	4h	
Biliverdine + FeSO <sub>4</sub> + CORM-2		50 $\mu$ M de chaque produit	4h	
Glutamate	augmente la production de CO	0.5, 0.8, 1, 2.5, 5 et 10 $\mu$ M	4h	Laboratoire Dr Raymund

intracellulaire				Wellinger
Hémoglobine	capte le CO intracellulaire	200 $\mu$ M	4h	Sigma

Chaque traitement des cellules est suivi de l'extraction d'ARN (protocole, p.34) des cellules HeLa ws et d'une RT-PCR spécifique pour TAF6 endogène (oligodT pour la RT protocole p.34; et T6-1B et T6-2E pour la PCR non-radioactive migré sur gel 15% non-dénaturant, oligonucléotides numéros 1 et 2, p. 27-29 et protocoles, p.35-36).

### ***Éléments répétitifs Alus***

#### *Extraction d'ADN génomique des HeLa ws*

Quatre cent mille cellules HeLa ws ont été réparties sur trois pétris de diamètre 10 cm et cultivées à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>, deux jours avant l'extraction. Un millilitre de Trizol (GibcoBRL) a été déposé sur chaque pétri et les cellules lysées ont été récoltées par pipettage. Les échantillons homogénéisés ont été incubés à température pièce pendant 5 minutes pour permettre une digestion optimale des parois des organelles et cellulaires. Deux cents microlitre de chloroforme ont été ajoutés, les échantillons ont été vigoureusement homogénéisés et reposés 2 minutes à température pièce. Les échantillons ont été centrifugés à 12 000 x g pendant 15 minutes à 4°C afin de séparer l'ARN de l'ADN et des protéines, présents dans l'interphase et la phase organique. La phase aqueuse contenant l'ARN a été retirée et 300  $\mu$ L d'éthanol 100% ont été ajoutés à l'interphase et à la phase organique. Les échantillons ont été mélangés par inversion et reposés 2 minutes à température pièce afin de précipiter l'ADN génomique. Puis, ils ont été centrifugés à 2 000 x g pendant 5 minutes à 4°C pour culotter l'ADN génomique. Le surnageant de phénol-éthanol contenant les

protéines a été retiré et le culot d'ADN a été lavé avec 1 mL de citrate de sodium 0.1 M dans l'éthanol 10%. Le culot a été lavé dans cette solution pendant 30 minutes à température pièce en mélangeant périodiquement. Les échantillons ont été centrifugés à 2 000 x g pendant 5 minutes à 4°C afin de culotter l'ADN. Le lavage a été refait une deuxième fois. Un troisième lavage avec 1 mL d'éthanol 75% pendant 20 minutes à température pièce a été effectué. Puis, les échantillons ont été centrifugés à 2 000 x g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot d'ADN a été séché à l'air ambiant pendant 15 minutes et resuspendu dans du NaOH 8 M afin de maintenir son intégrité sur une longue période.

#### *PCR sur BAC pour TAF6 de 5,4kb*

Le BAC (*bacterial artificial clone*, CTD-2132J1, Invitrogen) a été purifié par mini-préparation d'ADN plasmidique (voir protocole, p. 27). La PCR pour TAF6 a été menée en 35 cycles. Puis, 0.25µL de mini BAC ont été mélangés avec du tampon Taq polymérase 1X, 200 µM de chaque dNTPs, 400 nM de chaque oligonucléotide (voir tableau 1, oligonucléotides numéros 77 et 78, p.27-29), 2.8 U de Taq DNA polymérase et 0.5 U de Pfu DNA polymérase. Le protocole PCR a débuté par une dénaturation à 95°C pendant 5 minutes, puis une dénaturation cyclique à la même température a suivie pendant 2 minutes. L'hybridation des oligonucléotides à la séquence matrice a été effectuée à 59°C pendant 45 secondes et l'élongation à 72°C pendant 6 minutes. Ces étapes ont été faites sur deux cycles. La température d'hybridation des oligonucléotides a été modifiée à 66°C sur les 35 cycles suivants. Une dernière phase d'élongation a été menée à 72°C pendant 30 minutes et la réaction PCR a été conservée à 4°C pour un temps indéterminé. La PCR a été purifiée sur gel

d'agarose 0.8% et la bande à environ 5,4kb a été découpée et extraite par la trousse d'extraction d'ADN de gel d'agarose (Qiagen).

#### *Ligation de TAF6 5,4kb dans le vecteur de transfert, pCR-XL-TOPO*

La ligation dans le vecteur de transfert pCR-XL-TOPO (Invitrogen) et la transformation dans les bactéries *E. coli* OneShot TOP10 a été menée selon le protocole fourni avec la trousse TOPO<sup>®</sup> XL PCR Cloning kit d'Invitrogen. Des mini-préparations et des digestions de vérification par NheI, XhoI et EcoRI (New England Biolabs) ont été effectuées afin de vérifier la présence du plasmide pCR-XL-TOPO-TAF6 5,4kb dans les colonies de bactéries transformées (voir protocole des mini-préparations, p.30).

#### *Récupération de l'insert TAF6 de 5,4kb et insertion dans pcDNA3.1+*

Le vecteur pcDNA3.1+ et la mini-préparation de TOPO-TAF6 5,4kb ont été digérés en présence de NEBuffer 2 1X, BSA 100 µg/mL, 10 U de NheI et 20 U de XhoI pendant 3 heures à 37°C. Leur migration sur gel d'agarose 0.8% a permis de purifier le vecteur pcDNA3.1+ linéaire et l'insert de TAF6 5,4kb par la trousse d'extraction d'ADN de gel d'agarose (Qiagen). La ligation de TAF6 5,4kb dans le vecteur linéarisé pcDNA3.1+ a été menée en présence de tampon de ligation T4 DNA ligase 1X, 3 µL d'insert TAF6 5,4kb, 0.3 µL de vecteur linéarisé, pcDNA3.1+ (proportion de 1 vecteur pour 10 inserts) et 400 U de T4 DNA ligase (préparée par Catherine Desrosiers). Le vecteur linéarisé et l'insert TAF6 5,4kb ont été ligués pendant au moins 16 heures à 16°C et transformés dans les bactéries *E. coli* TOP10 (voir protocole de transformation, p.30).

### *PCR pour les éléments répétitifs Alus*

Tout d'abord, 0.26µg d'ADN génomique de cellules HeLa ws ont été mélangés avec 1X de tampon Taq DNA polymérase, 200 µM de chaque dNTPs, 400 ng de chaque oligonucléotides (T6inter2+ et corr.Mil2-, corr.Mil2+ et corr.Mil1-, voir tableau 1, p. 27-29, oligonucléotides numéros 79 à 82), 2.8 U de Taq DNA polymérase et 0.5 U de Pfu DNA polymérase pour effectuer la PCR. La PCR a été menée en 35 cycles. La dénaturation initiale a été faite à 94°C pendant 5 minutes, puis une dénaturation cyclique à la même température pendant 1 minute a été effectuée. L'hybridation des oligonucléotides à séquence matrice a été effectué à 55°C pendant 45 secondes et l'élongation a été faite à 72°C pendant 2 minutes. Une dernière élongation de 15 minutes à 72°C a suivie les 35 cycles. Les différentes parties de TAF6 ont été liguées dans pCR-XL-TOPO et transformées dans les bactéries *E. coli* OneShot TOP10 (voir protocole, p.53). Les mini-préparations des TOPO-TAF6 ont été séquencées à plate-forme de séquençage du Centre d'Innovation Université McGill Génome Québec avec des oligonucléotides spécifiques (voir tableau 1, p.27-29, oligonucléotides numéros 83 à 86) pour les éléments *Alus* présents dans TAF6.

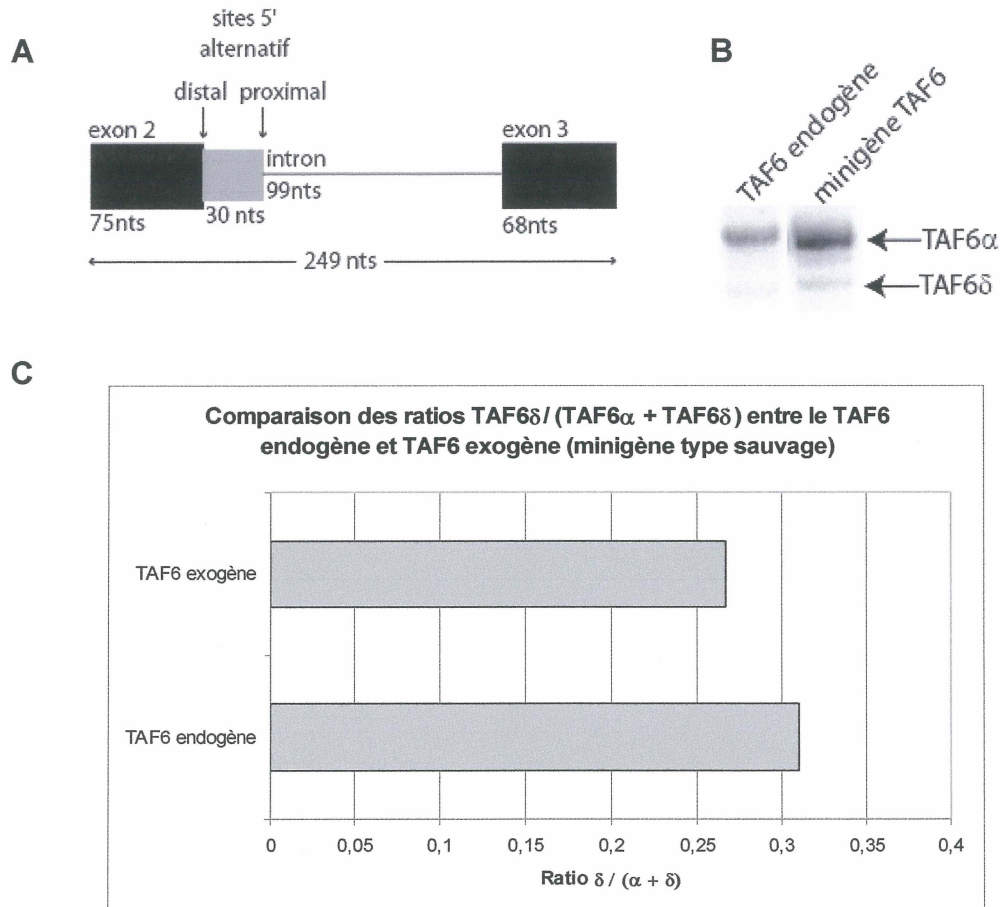


## **RÉSULTATS**

### **Éléments *cis***

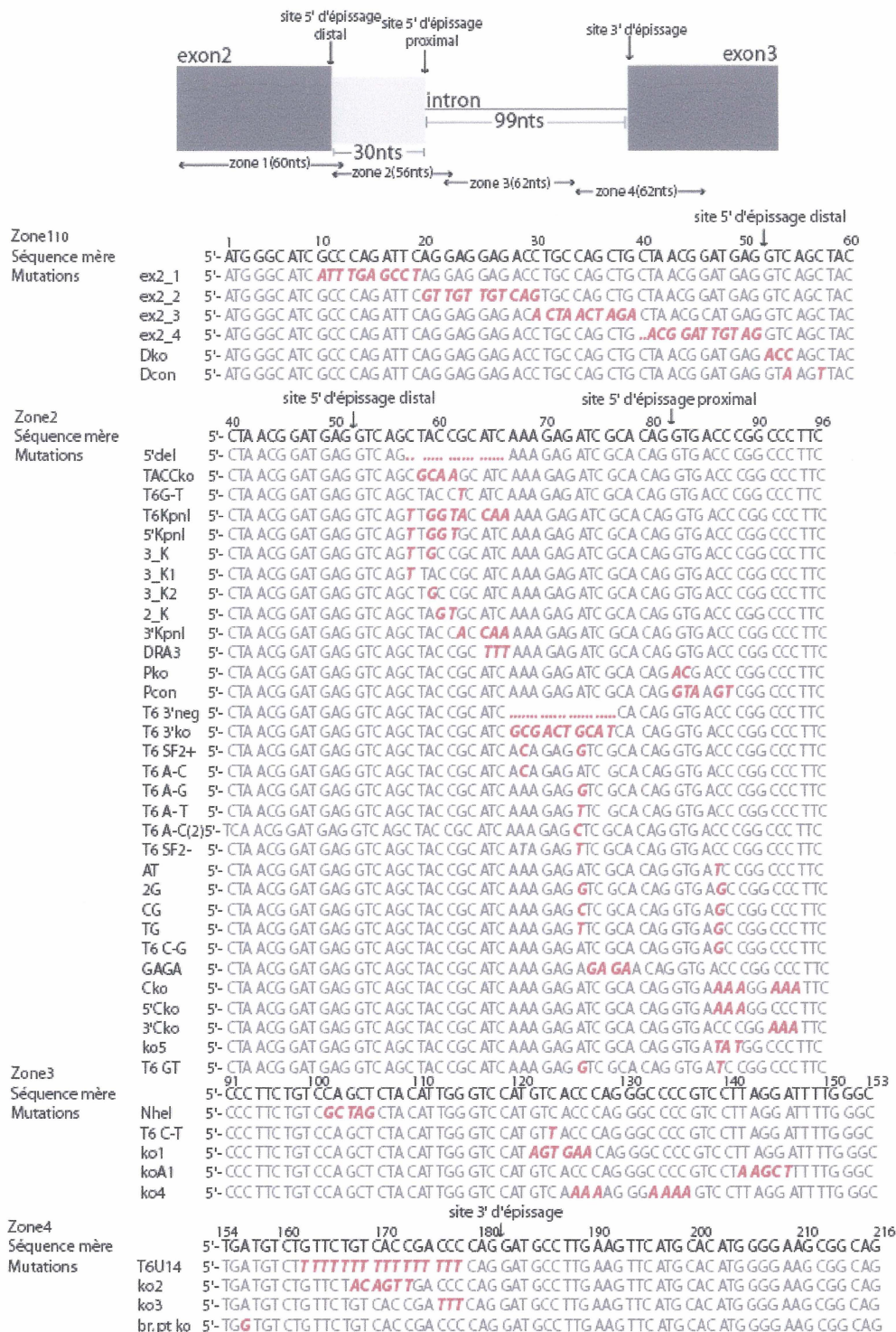
La découverte récente que TAF6 $\delta$  est un facteur pro-apoptotique, comparativement à l'isoforme alpha de la protéine et que l'induction de l'apoptose par TAF6 $\delta$  est indépendante de p53 rend l'étude ce co-facteur de transcription intéressante. L'épissage alternatif est le phénomène biologique qui entraîne la formation de TAF6 $\delta$  sous l'influence d'un signal apoptotique encore inconnu. Nous avons donc voulu savoir comment les éléments *cis* ARN agissent sur l'épissage alternatif de TAF6. Ainsi, nous avons développé un système afin de pouvoir étudier l'ARN de TAF6 au niveau des séquences conservées et des motifs de liaison de protéines. Le minigène de l'ARN de TAF6 englobe les exons 2 et 3, ainsi que l'intron situé entre les deux. Les deux sites 5' d'épissage alternatif se trouvent alors inclus dans le minigène de TAF6 ayant une taille de 249 nucléotides (figure 6A). Puis, différentes mutations ont été effectuées sur le minigène développé afin de déterminer les éléments *cis* agissant sur l'épissage alternatif de TAF6. Un alignement de la séquence de l'ARN de TAF6 de l'homme (*human*), du rat (*rattus*), de la souris (*mus musculus*), du chien (*canis*), du bovin (*bos taurus*), du chimpanzé (*pan troglodytes*), du macaque Rhesus (*rhesus*) et de l'opossum (*monodelphis domestica*) a permis d'identifier des séquences ou des nucléotides conservés de façon évolutive (annexe 1). Cet alignement a été facilité par le fait que la partie de l'ARN étudié ne fait que 249 nucléotides. Les logiciels, tel que le ESEfinder (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/>), ont été utilisés afin de déterminer les sites de liaison probables de protéines, par exemple, les protéines SR sur l'ARN de TAF6 (annexe 2).

Tout d'abord, la transfection du minigène type sauvage que nous avons développé afin d'étudier les éléments *cis* ARN en comparaison avec le TAF6 endogène démontre un ratio TAF6 $\delta$  / total d'épissage semblable et un patron d'épissage similaire (figure 6).



**Figure 6. Comparaison du TAF6 endogène et TAF6 produit par le minigène.** A) Schéma du minigène TAF6 crée afin d'étudier l'épissage alternatif de TAF6. B) Gel 15% non-dénaturant du RT-PCR des ARNs messagers de TAF6 endogène et TAF6 exogène dans les cellules HeLa ws. B) Graphique démontrant la similarité des ratios TAF6 $\delta$  / total d'épissage entre TAF6 endogène et TAF6 exogène (minigène).

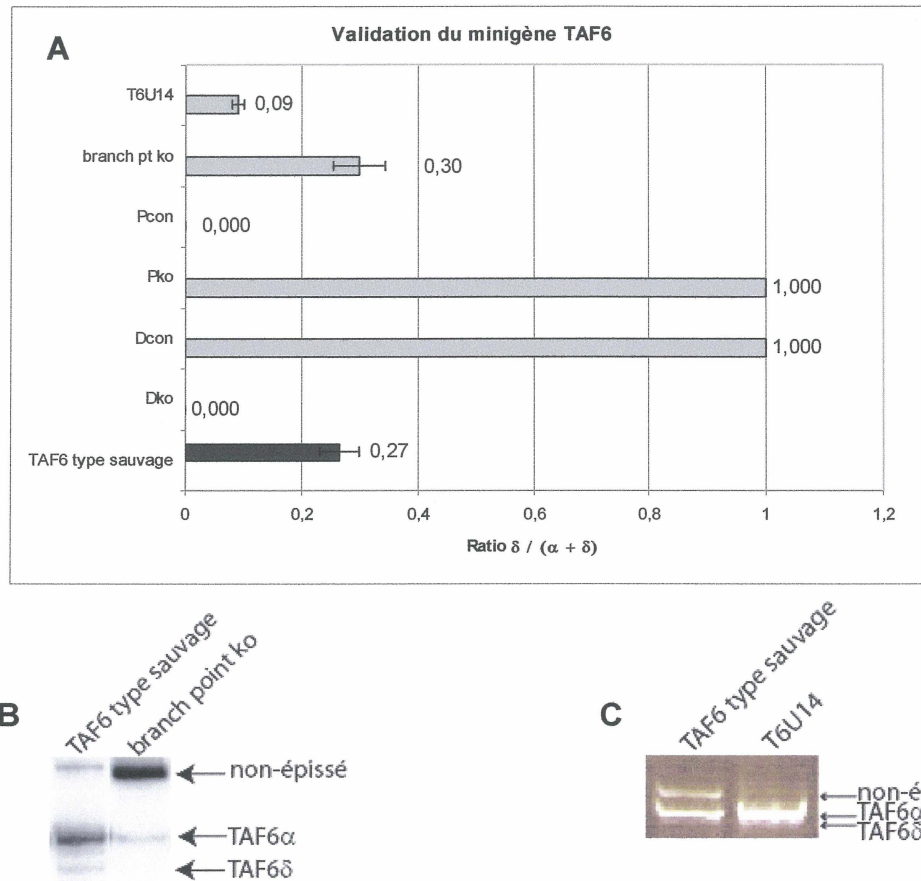
Les mutations ont été divisées en 4 zones sur le minigène qui comprend 249 nucléotides (figure 7).



Le mutant 2ko est composé des deux mutants ko1 et ko2.  
 Les doubles mutants : 3'Cko-ko3, 3'Cko-ko4, 3'Cko-ko5 ainsi que ex2\_1-ko3, ex2\_1-ko4 et ex2\_1-ko5 sont composés des deux mutants nommés.  
 Le mutant 3ko est composé des trois mutants: ex2\_1, 3'Cko et ko5.

**Figure 7. Position des mutations effectuées pour définir les éléments *cis* ARN.** Les noms des mutations représentent les nucléotides mutés ou les sites de restriction introduits dans le minigène. Les mutations introduites sont en caractères gras et en rouge sur les séquences.

Les premières mutations ont été faites sur les sites importants pour l'épissage, c'est-à-dire les sites 5' et 3' d'épissage, le point de branchement et la séquence riche en pyrimidine de l'intron, afin de savoir si le minigène développé se comporte de la même manière que le TAF6 endogène (figure 8).



**Figure 8. Validation du minigène TAF6 par mutations des sites d'épissage, point de branchement et de la séquence riche en pyrimidine.** A) Les ratios TAF6 $\delta$  / total d'épissage (TAF6 $\alpha$  + TAF6 $\delta$ ) ont été obtenus par quantification sur le logiciel ImageQuant ou par le logiciel du BioAnalyser 2100 d'Agilent des RT-PCR de mutants transfectés de façon transitoire dans les cellules HeLa ws. B) Gel de polyacrylamide 15% non-dénaturant de la RT-PCR radioactive pour le mutant *branch point ko* démontrant la perte d'épissage lors de cette mutation. C) Gel de polyacrylamide 15% non-dénaturant de la RT-PCR non-radioactive démontrant l'augmentation d'épissage dans les cellules HeLa ws transfectées transitoirement par la mutation T6U14.

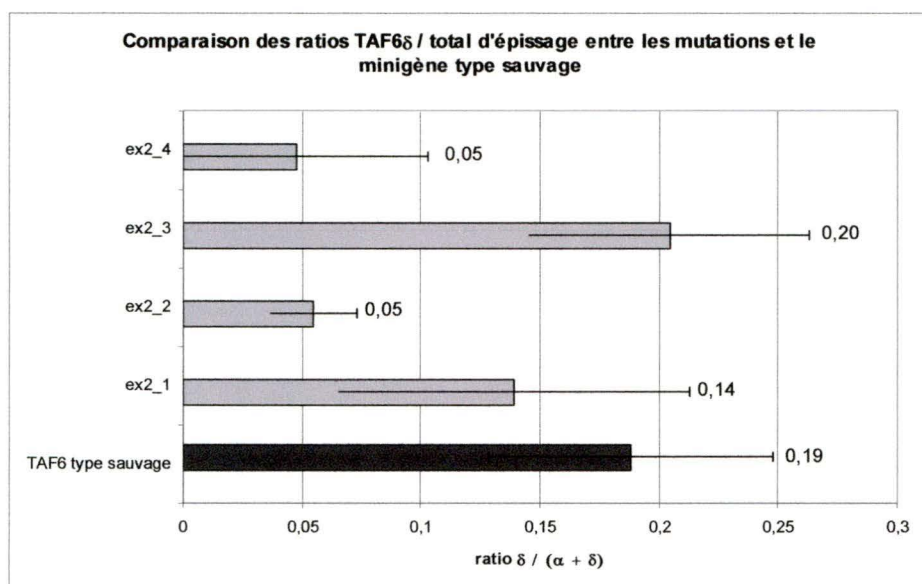
Les mutations Dko et Dcon sont situées au site 5' d'épissage alternatif distal, il s'agit du site d'épissage responsable de l'épissage alternatif de TAF6 $\delta$ . Le mutant Dko est la mutation ponctuelle du site d'épissage distal qui le rend inutilisable par la

machinerie d'épissage et démontre un épissage majoritaire de TAF6 $\alpha$ , ainsi qu'un épissage non détectable de TAF6 $\delta$  (figure 8A). La mutation en site consensus, Dcon, présente un épissage alternatif presque entièrement de TAF6 $\delta$  et un épissage non détectable de TAF6 $\alpha$  (figure 8A). Les mutations Pko et Pcon sont situées au niveau du site 5' d'épissage alternatif proximal, responsable de l'épissage alternatif de TAF6 $\alpha$ . Pko est la mutation ponctuelle du site d'épissage proximal le rendant inutilisable pour l'épissage et sa mutation entraîne l'épissage quasi exclusif de TAF6 $\delta$ , ainsi qu'un épissage non détectable de TAF6 $\alpha$ , donnant un ratio qui s'approche de 1.0 (figure 8A). La mutation en site consensus, Pcon, donne l'inverse. Cela signifie que le site d'épissage proximal est presque exclusivement utilisé, ce qui entraîne un épissage alternatif majoritairement composé de TAF6 $\alpha$  et un épissage non détectable de TAF6 $\delta$  (figure 8A). Les mutations négatives des sites 5' d'épissage alternatif ont permis d'affirmer que les sites peuvent être correctement utilisés dans le minigène de TAF6 et, donc, valident le minigène comme modèle d'étude de l'épissage alternatif de TAF6. Quant aux mutations en sites d'épissage consensus, elles ont permis de confirmer que la force relative des 2 sites 5' d'épissage alternatif est impliquée dans le choix du site 5' d'épissage. La mutation de l'adénosine du point de branchement potentiel en guanosine démontre une perte d'épissage par rapport au minigène type sauvage (figure 8B), signifiant qu'il s'agit bien du point de branchement de TAF6. Il existe suffisamment de transcrits pour calculer un ratio, car une certaine quantité de TAF6 $\alpha$  et de TAF6 $\delta$  est produite par épissage, le ratio TAF6 $\delta$  / total d'épissage ne change pas par rapport au minigène type sauvage. La mutation T6U14 introduit une séquence riche en pyrimidine en amont du site 3'



d'épissage, ce qui crée un site optimal pour la liaison du facteur U2AF qui joue un rôle dans la reconnaissance du site 3' d'épissage et, ainsi, augmente l'épissage. La figure 8C démontre très peu de TAF6 pré-messager (non-épissé) par rapport au minigène type sauvage et puisqu'il n'est pas calculé dans le ratio, celui est seulement affecté par l'augmentation de l'épissage de TAF6 $\alpha$  (figure 8A).

La zone 1 est constituée exclusivement des mutations de la partie constitutive de l'exon 2 de TAF6 (zone 1, figure 7). Cette partie de l'exon 2 a été mutée de façon systématique par motif de 10 nucléotides.

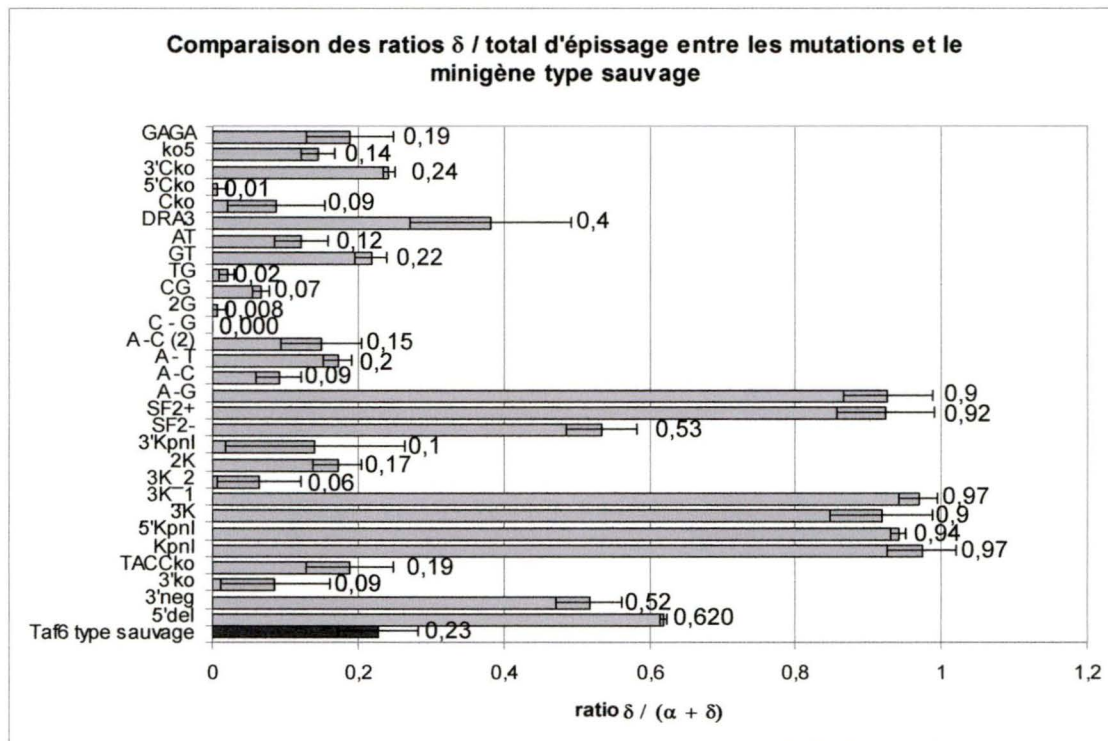


**Figure 9. Mutations dans la zone 1.** Les ratios de ces mutations ont été obtenus par quantification sur les micropuces d'électrophorèse capillaire du BioAnalyser 2100 d'Agilent des RT-PCR de mutants transfectés transitoirement dans les cellules HeLa ws.

Les mutations ex2\_1 et ex2\_3 ne montrent aucun changement significatif dans le ratio TAF6 $\delta$  / total d'épissage par rapport au minigène de type sauvage (figure 9). La mutation ex2\_2 montre un changement plus fort de ratio TAF6 $\delta$  / total d'épissage et indique que cette région entraîne un épissage plus fort de TAF6 $\alpha$  lorsque muté (figure 9). Le changement d'épissage obtenu avec la mutation ex2\_4 est légèrement plus fort

que celui obtenu par la mutation ex2\_2, mais présente quand même un plus grand épissage de TAF6 $\alpha$  lorsque muté (figure 9). Ces deux dernières mutations présentent donc des sites activateurs potentiels de l'épissage de TAF6 $\delta$ .

La deuxième zone englobe la partie alternative de l'exon 2 de TAF6, c'est aussi cette partie qui présente le plus grand nombre de mutations (zone 2, figure 7), car, dans des expériences précédentes, des oligonucléotides antisens qui s'apparient à cette zone forcent l'épissage alternatif de TAF6 $\delta$  endogène dans les cellules vivantes (WILHELM, E. et al, 2008).



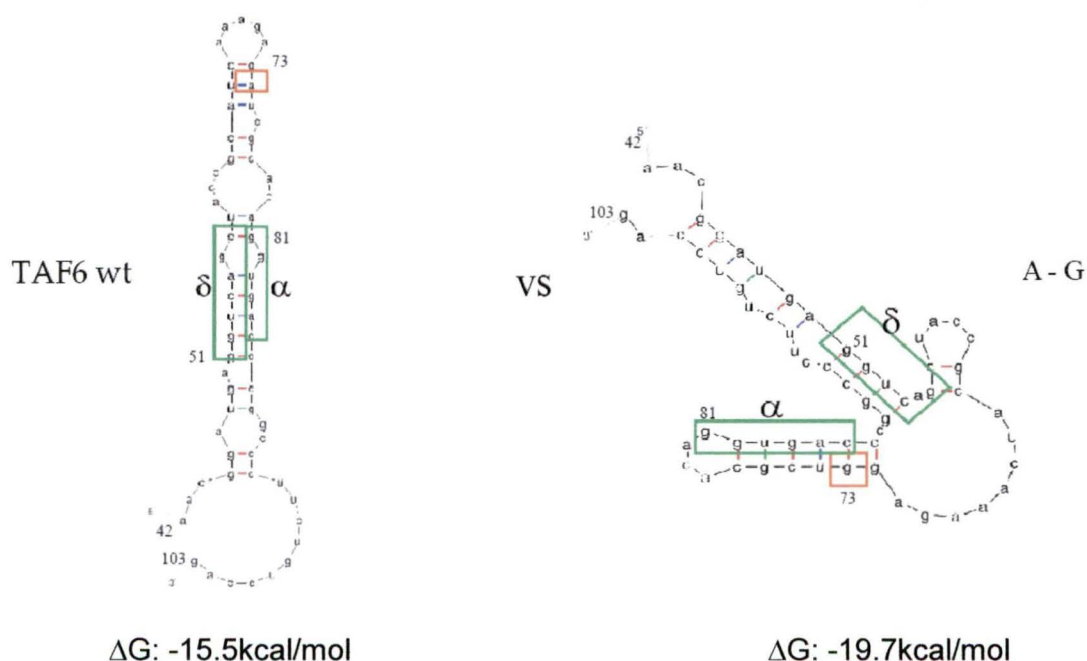
**Figure 10. Mutations dans la deuxième zone.** Ratios TAF6 $\delta$  / total d'épissage (TAF6 $\alpha$  + TAF6 $\delta$ ) obtenus par quantification sur ImageQuant et sur le logiciel du BioAnalyser 2100 d'Agilent pour les RT-PCR des mutants transfectés transitoirement dans les cellules HeLa ws.

Les mutations 5'del et 3'neg sont des délétions de 10 nucléotides dans la partie alternative de l'exon 2, ces délétions engendrent un épissage plus fort de TAF6 $\delta$  par rapport au minigène (figure 10). Par contre, la mutation de 10 nucléotides (3'ko) ne montre pas le même changement de ratio que les délétions. En fait, cette mutation ne

change que très peu le ratio TAF6 $\delta$  / total d'épissage par rapport au minigène type sauvage (figure 10). La mutation TACCKo commence en 5' du site d'épissage de TAF6 $\delta$ . Cette mutation n'indique aucun changement d'épissage et, donc, ce résultat suggère que cette séquence ne joue aucun rôle particulier dans l'épissage alternatif de TAF6 (figure 10). La mutation des 10 premiers nucléotides (mutant KpnI) a, par contre, changé de beaucoup le ratio TAF6 $\delta$  / total d'épissage. Les mutations ciblées de façon plus précise (5'KpnI, 3K et 3K\_1), montrent que ce changement de ratio est dû au fait que la mutation d'une cytosine en thymidine affecte le site 5' d'épissage distal responsable de l'épissage alternatif de TAF6 $\delta$  en améliorant l'utilisation ce site (figure 10). Par le logiciel ESEfinder (annexe 2), un site de liaison potentiel pour SF2/ASF a été trouvé dans la région des mutants SF2. SF2- est le mutant où le site de liaison potentiel a été détruit et ce mutant augmente la production de TAF6 $\delta$  (figure 10). Lorsque le même site de liaison potentiel est muté en site consensus de liaison, le mutant SF2+, il est possible d'observer un déplacement du patron d'épissage vers TAF6 $\delta$  (figure 10). Le mutant SF2+ comporte deux adénosines et la mutation individuelle de ces deux adénosines montrent que c'est la deuxième adénosine (A en position 73) qui, lorsque mutée en guanosine, inverse le patron d'épissage (mutant A-G et A-C, figure 10). Comme la mutation de la première adénosine ne change que de façon minime le ratio TAF6 $\delta$  / total d'épissage, cela indique que cette adénosine n'est pas celle qui contrôle l'inversion du patron d'épissage lorsque mutée (figure 10). La mutation de la deuxième adénosine en les autres nucléotides, cytosine (C) (mutant A-C(2)) et thymidine (T) (mutant A-T) n'influence pas le ratio TAF6 $\delta$  / total d'épissage, signifiant qu'il ne s'agit donc pas d'un site de liaison potentiel pour SF2/ASF (figure



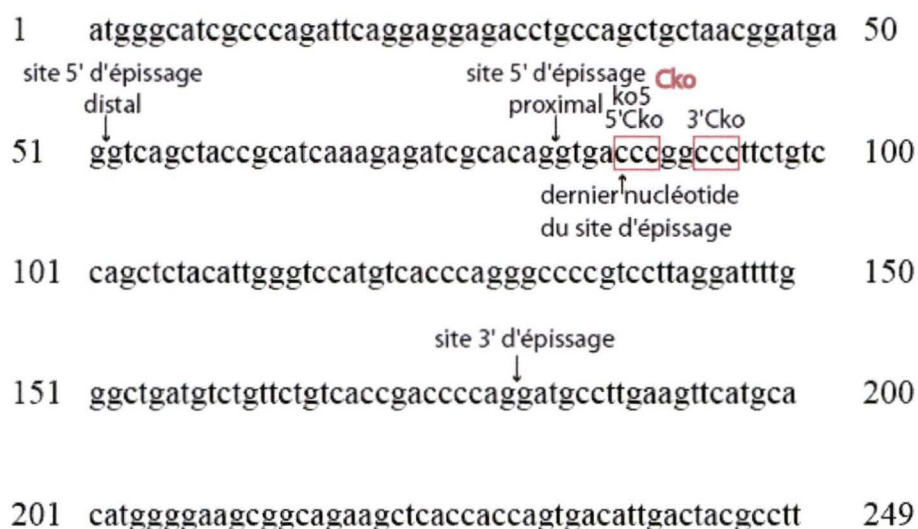
10). Par le logiciel mFold (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi>), nous avons obtenu des structures sensiblement différentes pour les séquences de TAF6 type sauvage et le mutant A – G de TAF6 (figure 11). Les structures secondaires hypothétiques ont été testées génétiquement par d'autres mutations. Les mutations 2G, CG et TG (nucléotides en position 73 et 86) ont été déterminées par le partenaire de liaison hypothétique au mutant A – G, une cytosine (position 86) qui a été remplacée par une guanosine. Ce faisant, le site 5' d'épissage devient plus fort, puisque la cytosine se retrouve au niveau du site 5' d'épissage alternatif proximal et, donc, cela augmente l'épissage de TAF6 $\alpha$  (figure 10). La mutation du partenaire de liaison supposé de la guanosine en uracile permet de retrouver le patron d'épissage normal (mutant GT, figure 10).



**Figure 11. Structure secondaire potentielle de TAF6 type sauvage et TAF6 A – G.** Les structures montrées ici ont été obtenues par le logiciel mFold à partir d'une partie de la séquence (nucléotides en position 42 à 103) du minigène TAF6. Les nucléotides dans les boîtes vertes représentent les deux sites 5' d'épissage, soit le site proximal ( $\delta$ ) et distal ( $\alpha$ ). Le nucléotide dans la boîte orange représente l'adénosine (TAF6 wt) qui, une fois, mutée en guanosine (A – G) inverse le patron d'épissage normal en modifiant la structure secondaire de l'ARN.

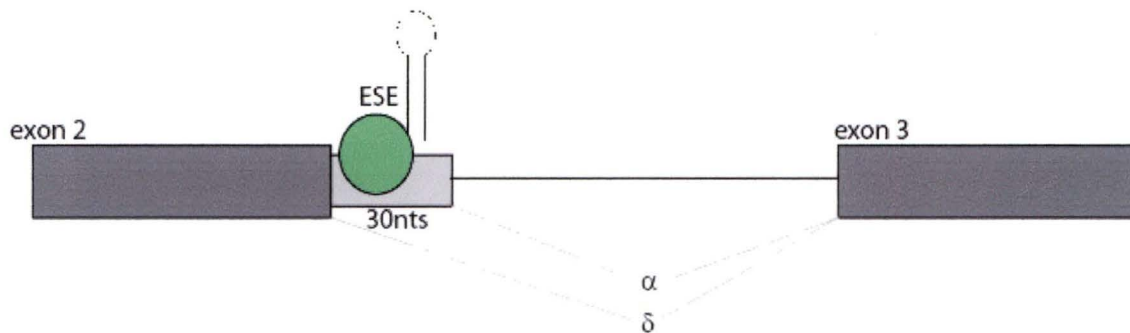
Afin de vérifier si l'appariement G-C (mutant A-G en position 73 et nucléotide C en position 86) est essentiel pour entraîner l'épissage de TAF6 $\delta$ , la mutation du C en position 86 en T (mutant AT) a été effectuée afin de tenter d'inverser le patron d'épissage dans le type sauvage (figure 10). Cette mutation ne favorise pas l'épissage de TAF6 $\delta$ , suggérant qu'un appariement G-C est nécessaire pour inverser le patron d'épissage. De plus, cette mutation est complètement à l'inverse de la mutation en consensus du site d'épissage proximal (Pcon, figure 8). La mutation A-G (figure 10) montre un épissage de TAF6 $\delta$  plus grand que le mutant GT (figure 10) qui, quant à elle, montre un profil d'épissage normal (mutant GT comparé au TAF6 type sauvage, figure 10). Une deuxième mutation a aussi été introduite afin de modifier le site potentiel de liaison de SF2/ASF (mutant GAGA). Cette mutation n'a pas entraîné de changement au niveau du ratio et, donc, SF2/ASF ne se lie probablement pas à cet endroit (figure 10). Le logiciel de détermination de séquence de liaison potentielle a identifié un site potentiel de liaison pour la protéine SRp20 (HARGOUS, Y. et al, 2006) dans les 10 premiers nucléotides de la partie alternative de l'exon 2 de TAF6 (annexe 2). La mutation de ce site en site de restriction DRA3 a permis de démontrer que ce site joue un rôle dans l'épissage alternatif de TAF6, car sa mutation provoque un changement significatif du ratio TAF6 $\delta$  / total d'épissage en favorisant TAF6 $\delta$  (figure 10). De plus, le motif polyC au tout début de l'intron (mutant Cko (5'Cko + 3'Cko), 5'Cko, 3'Cko et ko5) semble avoir une certaine importance puisque les mutations 5'Cko et ko5 change le ratio TAF6 $\delta$  / total d'épissage en favorisant TAF6 $\alpha$  (figure 10). Par contre, les sites des mutations 5'Cko et ko5 affectent par un nucléotide le site 5' d'épissage proximal et, ainsi, il est impossible présentement de

savoir si ce site est un site de liaison potentiel d'un facteur *trans* ou si la mutation affecte le site d'épissage même de TAF6 $\alpha$  et que cela est responsable du changement du ratio TAF6 $\delta$  / total d'épissage.



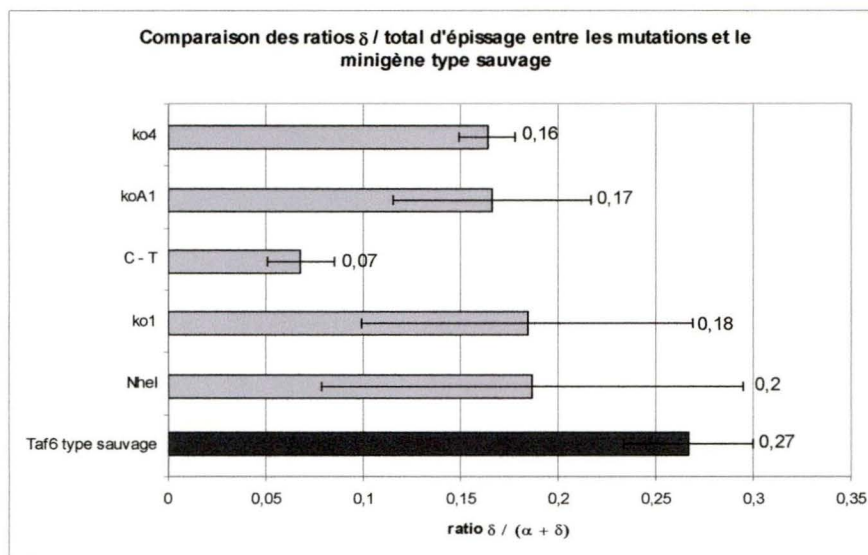
**Figure 12. Position des mutants Cko, 5'Cko, 3'Cko et ko5.** Les nucléotides modifiés par la mutation Cko sont encadrés en rouge. Les mutants 5'Cko et ko5 modifient les 3 premières cytosines de l'intron et touchent par un nucléotide au site 5' d'épissage proximal. Le mutant 3'Cko est composées des 3 cytosines suivantes et ne touchent aucunement au site 5' d'épissage proximal.

Bref, il est important que la partie alternative de l'exon 2 soit de 30 nucléotides, car le rapprochement des deux sites 5' d'épissage amène une modification dans le profil d'épissage de TAF6 entraînant un changement vers TAF6 $\delta$ . De plus, l'adénosine en position 73 du minigène joue un rôle dans le maintien d'une structure secondaire qui favorise l'épissage de TAF6 $\alpha$ , car lorsqu'elle est mutée, il y a inversion du patron d'épissage de TAF6. Aussi, la mutation de trois nucléotides (nucléotides en position 64 à 66, figure 7) afin de diminuer l'affinité de ce site potentiel pour la liaison de la protéine SRp20 dérange l'épissage normal de TAF6, un site activateur de l'épissage (ESE) pourrait se situer à cet endroit.



**Figure 13. Position des éléments importants de la deuxième zone.** Les différentes mutations effectuées dans cette zone ont permis d'identifier quelques éléments *cis* importants dans le choix du site 5' d'épissage. Un ESE serait présent dans les 15 premiers nucléotides de cette zone (nucléotides 64 à 66). De plus, une adénosine est importante dans le maintien d'une structure secondaire de l'ARN. Les 30 nucléotides de la partie alternative de l'exon 2 permettent d'influencer le choix du site 5' d'épissage.

La troisième zone est constituée de mutations situées surtout au niveau de l'intron (zone 3, figure 7).



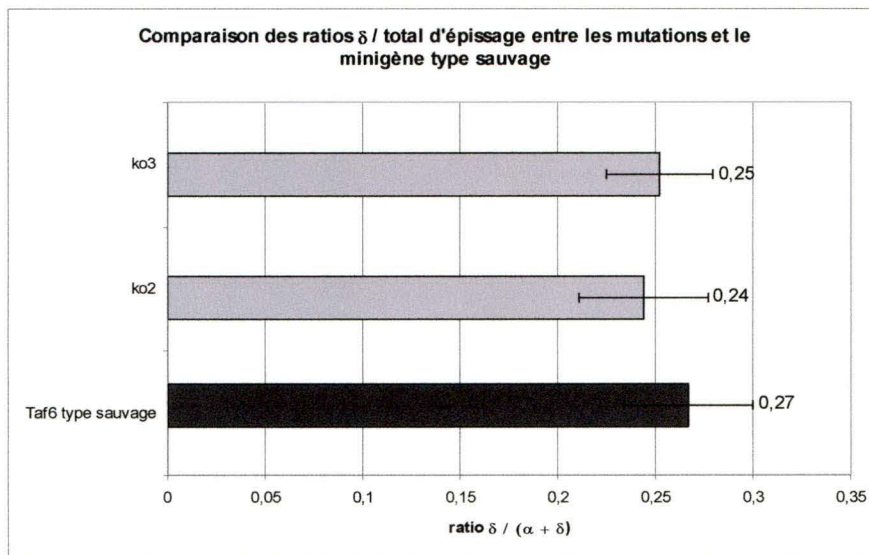
**Figure 14. Mutations dans la zone 3.** Les ratios TAF6 $\delta$  / total d'épissage ont été déterminés par quantification sur les logiciels du BioAnalyser 2100 et ImageQuant des RT-PCR des mutations transfectées de façon transitoire dans les cellules HeLa ws.

Un motif conservé (voir annexe 1) a été muté en site de restriction NheI. Le mutant n'a pas influencé l'épissage de TAF6, ce qui signifie qu'il n'y a probablement pas de fonction associée à cette séquence conservée (figure 14). Les séquences d'ARN

peuvent se replier et, dans le cas de TAF6, il existe une possibilité de repliement au niveau d'une séquence intronique (nucléotides en position 121 à 126 sur le minigène, voir figure 7, p.57) qui peut se replier sur le site 5' proximal de la partie alternative de l'exon 2 (nucléotides en position 81 à 86). Cela peut affecter l'épissage en cachant un des deux sites 5' d'épissage. La mutation ko1 a été effectuée afin d'empêcher ce repliement, le résultat montre que cette mutation n'a aucune influence sur l'épissage de TAF6 (figure 14). De plus, une cytosine en position 123 est fortement conservée (voir annexe 1) dans l'intron. Des 8 espèces utilisées dans l'alignement de séquence (annexe 1), 5 présentent cette cytosine. La mutation en une uracile de cette cytosine entraîne un changement au niveau du patron d'épissage et donc, cette cytosine joue un rôle au niveau de l'épissage alternatif de TAF6 (mutant C-T, figure 14). La mutation du site de liaison potentiel de hnRNP A1 (BURD, C.G. et DREYFUSS, G., 1994) n'a démontré aucun changement au niveau du ratio TAF6 $\delta$  / total d'épissage (annexe 2 et figure 14). Il est donc peu probable d'avoir la liaison de hnRNP A1 à cet endroit. Un autre motif composé de plusieurs cytosines pourrait être un site de liaison potentiel d'un membre de la famille des protéines de liaison au polyC (PCBPs) ou de hnRNP K. La mutation ko4 modifie toutes les cytosines en adénosines et, ainsi, détruit complètement le site de liaison potentiel. Ce faisant, il est possible d'observer un changement de ratio TAF6 $\delta$  / total d'épissage qui favorise l'épissage alternatif de TAF6 $\alpha$  (figure 14).

La dernière zone est aussi constituée de mutations dans l'intron (zone 4, figure 7).

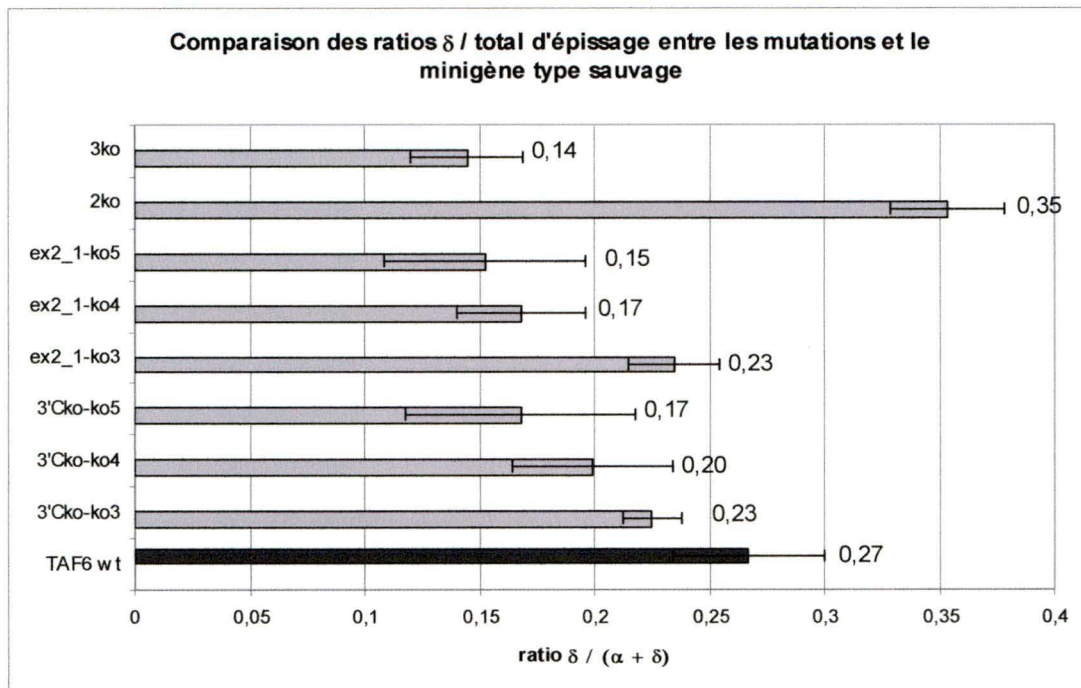




**Figure 15. Mutations dans la zone 4.** Les ratios  $TAF6\delta / (TAF6\alpha + TAF6\delta)$  ont été obtenus par quantification par le logiciel ImageQuant des bandes de  $TAF6\delta$  et de  $TAF6\alpha$  des gels 15% non-dénaturant des RT-PCR des mutations transfectées transitoirement dans les cellules HeLa ws.

La mutation ko2 a aussi été effectuée afin de déstabiliser un repliement de la séquence ARN intronique sur la partie alternative de l'exon 2 de TAF6. Il est observable que cette mutation ne modifie pas l'épissage de TAF6 (figure 15). La mutation d'un autre motif polyC dans l'intron, ko3, ne montre aucun changement dans le ratio  $TAF6\delta / \text{total d'épissage}$  et, donc, que la liaison d'une protéine PCBP est improbable à cet endroit de l'intron (figure 15).

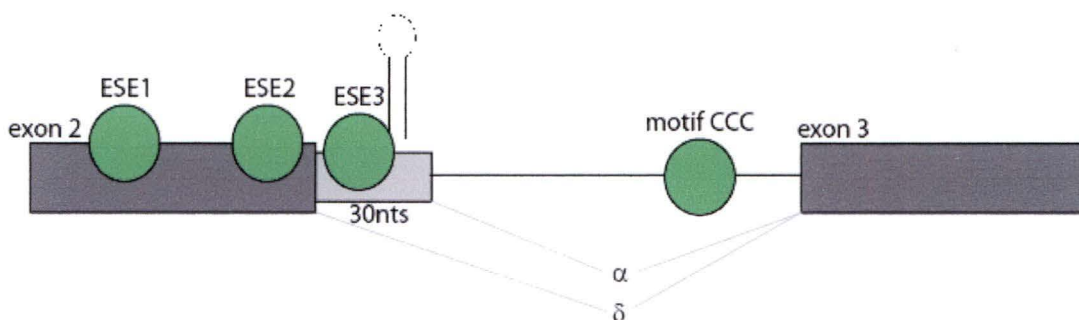
Des mutations double et triple ont été effectuées afin de déterminer s'il existe de la coopération entre certains sites de la séquence de l'ARN de TAF6.



**Figure 16. Mutations double et triple dans la séquence du minigène TAF6.** Ces mutations impliquent des mutations dans les 4 zones de TAF6 et permettent de vérifier la coopération de ces sites dans leur influence sur l'épissage alternatif de TAF6. Ces ratios TAF6 $\delta$  / (TAF6 $\alpha$  + TAF6 $\delta$ ) ont été déterminés par quantification par le logiciel ImageQuant des RT-PCR des mutations transfectées de façon transitoire dans les cellules HeLa ws.

Les mutations individuelles ex2\_1, 3'Cko et ko3 n'affectent pas l'épissage, tandis que les mutations ko4 et ko5 l'affectent (figures 9, 10, 14 et 15). Les mutations doubles 3'Cko-ko3, ex2\_1-ko3 ne montrent aucun changement au niveau de l'épissage de TAF6 (figure 16). Par contre, les mutations doubles 3'Cko-ko4, ex2\_1-ko4 et 2ko (composé des mutations ko1 et ko2) montrent un changement significatif de l'épissage de TAF6 (figure 16). Les deux motifs individuellement mutés dans ko1 et ko2 n'affectent pas le patron d'épissage et, ainsi, il est possible que ces deux sites soient redondants. Donc, cela prend la mutation des deux motifs afin d'induire un changement significatif de l'épissage alternatif de TAF6 vers TAF6 $\delta$  (figure 16). Il est probable que la présence de la mutation ko4 est celle qui affecte le plus le ratio puisque de façon individuelle, elle influence l'épissage en favorisant TAF6 $\alpha$  (figure 14). Les mutations doubles avec ko5 changent aussi un peu le patron d'épissage, mais

puisque ko5 affectent un peu le site 5' d'épissage, il est probable que ce soit l'effet de cette mutation (figure 10 et 16). Le triple mutant 3ko est composé des mutations ex2\_1, 3'Cko et ko5 et semble favoriser l'épissage alternatif de TAF6 $\alpha$ , mais comme ko5 affecte peut-être le site 5' d'épissage proximal en le rendant plus fort, il est possible que ce soit l'effet de cette mutation seule (figure 16). Il n'est donc pas possible de conclure sur un effet coopératif entre ces 3 sites de TAF6.



**Figure 17. Résumé des éléments *cis* déterminés dans la séquence du minigène de TAF6.** 6 éléments *cis* sont schématisés dans ce modèle du minigène TAF6. 3 ESEs potentiels ont été déterminés dans l'exon 2. La structure secondaire est maintenue par une adénosine en position 73 et les 30 nucléotides de la partie alternative de l'exon 2 sont nécessaires au choix du site 5' d'épissage. Un motif CCC est présent dans l'intron et influence le profil d'épissage normal de TAF6.

En résumé, 6 éléments *cis* ont été identifiés par ces mutations. Au niveau de la partie constitutive de l'exon 2 (mutants ex2\_2 et ex2\_4, figure 9), deux ESEs (ESE1 et ESE2, figure 17) potentiels sont présents. Puis, dans la partie alternative de l'exon 2, nous avons pu déterminer que les 30 nucléotides de cette zone sont importants dans le choix du site 5' d'épissage. De plus, un autre site activateur de l'épissage (ESE3, figure 17) est présent et influence l'épissage alternatif de TAF6 (mutant DRA3, figure 10). La mutation de l'adénosine en position 73 en guanosine permet de créer une structure secondaire plus stable qui inverse le profil d'épissage normal de TAF6. Finalement, dans l'intron, nous retrouvons un motif CCC qui influence le patron d'épissage alternatif de TAF6 (mutant ko4, figure 14).



## **Facteurs *trans***

Pour bien comprendre le mécanisme d'épissage alternatif qui contrôle l'expression de TAF6 $\delta$  versus TAF6 $\alpha$ , il est important de connaître les facteurs *trans* liant les éléments *cis*. Le Laboratoire de Génomique Fonctionnelle de l'Université de Sherbrooke (LGFUS) possède les outils permettant d'inhiber systématiquement un ensemble de protéines liant l'ARN. Des siRNAs contre des protéines liants l'ARN ont été utilisés afin d'inhiber l'expression de ces protéines dans 7 lignées cellulaires, puis, l'ARN a été extrait et une transcription inverse a été effectuée sur ces ARNs. Nous avons effectué un criblage PCR de ces échantillons d'ADNc afin de déterminer l'implication de ces protéines liants l'ARN dans l'épissage alternatif de TAF6. Nous avons porté une attention particulière aux protéines de liaison aux motifs polyC, étant donné le résultat obtenu avec le mutant ko4 (figure 14). Les 7 lignées cellulaires utilisées par le LGFUS pour la transfection des siRNAs contre les protéines de liaison à l'ARN sont : les cellules HeLa, des adénocarcinomes épithéliaux du col de l'utérus, les BJ, des fibroblastes normaux, les PC3, des adénocarcinomes prostatiques métastatiques, les MCF7, des adénocarcinomes des glandes mammaires métastatiques, les MDA-MB-231, des adénocarcinomes des glandes mammaires métastatiques, les Skov3, des adénocarcinomes ovariens métastatiques et les Ovar3, des adénocarcinomes ovariens. Nous avons ainsi pu tester 75 protéines et, pour les premières séries d'ADNc, la PCR que nous avons utilisé a produit des fragments non-marqués à la radioactivité. Donc, les résultats préliminaires sont qualitatifs plutôt que semi-quantitatif (annexe 3), nous avons, par la suite, changé pour une PCR radioactive, car les résultats obtenus n'étaient pas reproductibles, probablement dû au grand nombre de cycles PCR fait pour la PCR non-radioactive. Pour retenir une

protéine comme facteur *trans* potentiel, nous avons défini des critères. Premièrement, les deux siRNAs contre cette protéine doivent avoir modifié le ratio TAF6 $\delta$  / total d'épissage dans plus d'une lignée cellulaire. De plus, le changement de patron d'épissage devait être d'au moins 10%. La PCR radioactive a l'avantage de permettre une quantification indirecte à l'aide du logiciel ImageQuant et nécessite moins de cycles, ce qui permet d'obtenir des résultats plus reproductibles.

**Tableau 3. Reprise par PCR radioactive des échantillons positifs dans les 6 premières séries (voir graphiques 1 et 2, annexe 4)**

Nom du siRNA	HeLa	BJ	PC3	MCF7	MDA-MB-231	Skov3	Ovc3
contrôle	0,229	0,216	0,196	0,181	0,245	0,291	0,346
hnRNP D-1	0,245	0,200	0,192	0,183	0,248	0,324	0,193
hnRNP D-2	0,221	0,195	0,168	0,186	0,233	0,216	0,186
contrôle	--	--	--	--	--	0,234	--
IMP3-1	--	--	--	--	--	0,228	--
IMP3-2	--	--	--	--	--	0,214	--
contrôle	--	--	--	--	--	0,234	--
KHRBS-2	--	--	--	--	--	0,228	--
contrôle	0,211	0,183	0,177	0,183	0,211	0,239	0,191
hnRNP K-1	0,211	0,181	0,169	0,176	0,218	0,221	0,266
hnRNP K-2	0,193	0,172	0,148	--	0,219	0,213	--

Des 135 siRNAs contre les 75 différentes protéines, seules hnRNP D, IMP3 (U3 snoRNP), KHRBS (Sam68) et hnRNP K semblaient positives pour un changement de ratio TAF6 $\delta$  / total d'épissage d'au moins 10% dans plus d'une lignée (annexe 3 et tableau 3). Avec la PCR radioactive qui est beaucoup plus sensible que la PCR non-radioactive, nous avons pu déterminer que l'inhibition d'IMP3 et de KHRBS ne changeait pas l'épissage alternatif de TAF6 de façon significative (tableau 3). Quant à hnRNP D, l'inhibition de cette protéine semble entraîner un changement d'épissage dans 4 lignées cellulaires (BJ, PC3, Skov3 et Ovc3) et, parfois, avec un seul siRNA au lieu de deux, nous ne l'avons donc pas retenu comme facteur *trans* potentiel (tableau 3). L'inhibition d'hnRNP K amène un changement d'épissage de TAF6,

favorisant TAF6 $\alpha$ , dans 5 des 7 lignées cellulaires testées (HeLa, BJ, PC3, MCF7 et Skov3) (tableau 3). Tandis que dans les deux autres lignées (MDA-MB-231 et Ovc3), l'inhibition d'hnRNP K provoque un changement d'épissage qui favorise TAF6 $\delta$ . Aucun des siRNAs contre ces 75 protéines (tableau 3 et 4 et annexe 3) n'a donné de changement significatif dans le ratio TAF6 $\delta$  / TAF6 $\alpha$ . Nous avons décidé de retenir hnRNP K comme facteur *trans* potentiel, malgré le fait qu'il ne respectait pas les critères défini. Nous avons considéré hnRNP K, car l'analyse de la séquence de TAF6 a permis d'identifier des motifs CCC de liaison à hnRNP K. En fait, les CCC sont les seuls motifs identifiables qui sont conservés dans l'intron. De plus, hnRNP K est une protéine de liaison au motif riche en cytosine (polyC) et le résultat du mutant ko4 d'un motif polyC encourage l'hypothèse de la liaison d'hnRNP K dans l'intron. Les autres protéines inhibées par la transfection des 2 siRNAs n'ont pas montrées d'influence significative sur l'épissage alternatif de TAF6 (tableau 4).

**Tableau 4. Résultats des ratios TAF6 $\delta$  / total d'épissage en fonction des protéines inhibées par différents siRNAs transfectés dans 5 lignées cellulaires (voir graphiques 3 à 21, annexe 4)**

Nom du siRNA	PC3	MCF7	MDA-MB-231	Skov3	Ovc3
contrôle	0,252	0,266	0,237	--	--
ADAR-2	0,232	0,217	0,218	--	--
contrôle	0,176	0,186	--	--	0,219
BRCA1-1	0,170	0,172	--	--	0,232
BRCA1-2	0,181	0,174	--	--	0,218
contrôle	0,176	0,186	--	--	0,219
CASC3-1	0,161	0,179	--	--	0,247
CASC3-2	0,198	0,178	--	--	0,221
contrôle	0,175	0,186	0,226	0,224	--
CCNH-1	0,213	0,172	0,229	0,236	--
CCNH-2	0,166	0,172	0,220	0,227	--
contrôle	0,172	0,184	0,300	0,207	--
CDC5L-1	0,146	0,152	0,244	0,184	--
CDC5L-2	0,173	0,161	0,263	0,225	--
contrôle	0,197	--	0,217	0,216	--
CDK11-1	0,183	--	0,218	0,195	--
CDK11-2	0,182	--	0,223	0,202	--
contrôle	0,175	0,186	0,226	0,224	--



CRK7-1	0,229	0,197	0,275	0,252	--
CRK7-2	0,225	0,200	0,240	0,261	--
contrôle	0,197	0,176	0,217	0,216	--
CTNNB1-1	0,194	0,186	0,230	0,210	--
CTNNB1-2	0,204	0,190	0,233	0,204	--
contrôle	0,197	--	--	--	--
CUGBP1-1	0,162	--	--	--	--
CUGBP1-2	0,175	--	--	--	--
contrôle	--	--	--	0,216	0,179
DEK-1	--	--	--	0,212	0,176
DEK-2	--	--	--	0,181	0,191
contrôle	0,196	0,173	0,223	0,216	--
DDX6-1	0,179	0,177	0,217	0,218	--
DDX6-2	0,179	0,173	0,206	0,230	--
contrôle	0,374	0,211	0,237	--	--
DDX39-1	0,248	0,201	0,226	--	--
DDX39-2	0,242	0,215	0,212	--	--
contrôle	0,172	--	--	0,214	--
EIF4A2-1	0,172	--	--	0,209	--
EIF4A2-2	0,165	--	--	0,210	--
contrôle	0,172	0,214	0,209	0,216	--
EWSR1-1	0,140	0,177	0,187	0,188	--
EWSR1-2	0,147	0,220	0,214	0,214	--
contrôle	0,176	--	--	0,213	0,219
FIP1L1-1	0,172	--	--	0,178	0,210
FIP1L1-2	0,145	--	--	0,216	0,211
contrôle	0,207	0,200	0,173	0,209	--
FMR1-1	0,204	0,182	0,221	0,222	--
FMR1-2	0,198	0,201	0,217	0,199	--
contrôle	0,181	0,174	--	--	--
FUS-1	0,148	0,149	--	--	--
FUS-2	0,170	0,158	--	--	--
contrôle	0,181	0,174	0,212	0,201	--
FXR1-1	0,188	0,193	0,220	0,201	--
FXR1-2	0,179	0,180	0,213	0,199	--
contrôle	0,183	0,175	--	--	--
HEAB-1	0,210	0,179	--	--	--
HEAB-2	0,174	0,174	--	--	--
contrôle	--	--	--	0,216	0,179
HMGA1-1	--	--	--	0,214	0,182
HMGA1-2	--	--	--	0,213	0,190
contrôle	--	--	--	0,220	--
hnRNP A1-5	--	--	--	0,219	--
hnRNP A1-6	--	--	--	0,197	--
contrôle	--	--	--	0,220	0,216
hnRNP A2-1	--	--	--	0,219	0,211
hnRNP A2-2	--	--	--	--	0,202
hnRNP A2-3	--	--	--	0,218	--
contrôle	--	--	--	0,215	--
hnRNP C-2	--	--	--	0,256	--

hnRNP C-3	--	--	--	0,238	--
contrôle	--	--	--	0,215	--
hnRNP D-1	--	--	--	0,208	--
hnRNP D-2	--	--	--	0,213	--
contrôle	--	--	--	0,220	0,216
hnRNP F-1	--	--	--	0,269	0,237
hnRNP H-1	--	--	--	0,247	0,217
hnRNP F/H	--	--	--	0,259	0,225
contrôle	0,172	0,184	0,300	0,207	--
KHDRBS3-1	0,199	0,162	0,276	0,228	--
KHDRBS3-2	0,178	0,195	0,275	0,225	--
contrôle	--	--	--	0,199	--
KHRBS-1	--	--	--	0,233	--
contrôle	0,252	0,266	0,237	--	--
KHSRP-1	0,219	0,202	0,227	--	--
KHSRP-2	0,245	0,202	0,228	--	--
contrôle	0,201	0,184	0,300	0,207	--
MBNL1-1	0,169	0,171	0,283	0,197	--
MBNL1-2	0,176	0,164	0,299	0,200	--
contrôle	--	0,175	--	--	--
MS12-1	--	0,205	--	--	--
MS12-2	--	0,204	--	--	--
contrôle	0,173	0,207	--	--	0,207
NONO-1	0,190	0,194	--	--	0,207
NONO-2	0,183	0,187	--	--	0,224
contrôle	0,201	--	--	0,224	0,179
NOVA-1	0,199	--	--	0,332	0,204
NOVA-2	0,173	--	--	0,249	0,187
contrôle	0,173	0,207	--	--	--
NPM1	0,176	0,186	--	--	--
NPM1-1	0,174	0,180	--	--	--
contrôle	0,181	0,174	--	--	--
PRPF4B-1	0,176	0,176	--	--	--
PRPF4B-2	0,188	0,174	--	--	--
contrôle	0,201	--	--	0,216	--
PRPF8-1	0,213	--	--	0,229	--
PRPF8-2	0,198	--	--	0,240	--
contrôle	0,191	--	--	0,201	0,209
Raly-1	0,214	--	--	0,210	0,218
Raly-2	0,212	--	--	0,209	0,192
contrôle	0,160	--	--	0,220	--
RBM8A-1	0,174	--	--	0,243	--
RBM8A-2	0,167	--	--	0,283	--
contrôle	0,160	0,174	--	0,220	--
RBM8B-1	0,174	0,185	--	0,239	--
RBM8B-2	0,181	0,180	--	0,244	--
contrôle	--	0,190	0,207	--	0,186
RBM9-1	--	0,182	0,162	--	0,179
RBM9-2	--	0,168	0,203	--	0,233
contrôle	--	--	--	--	0,227

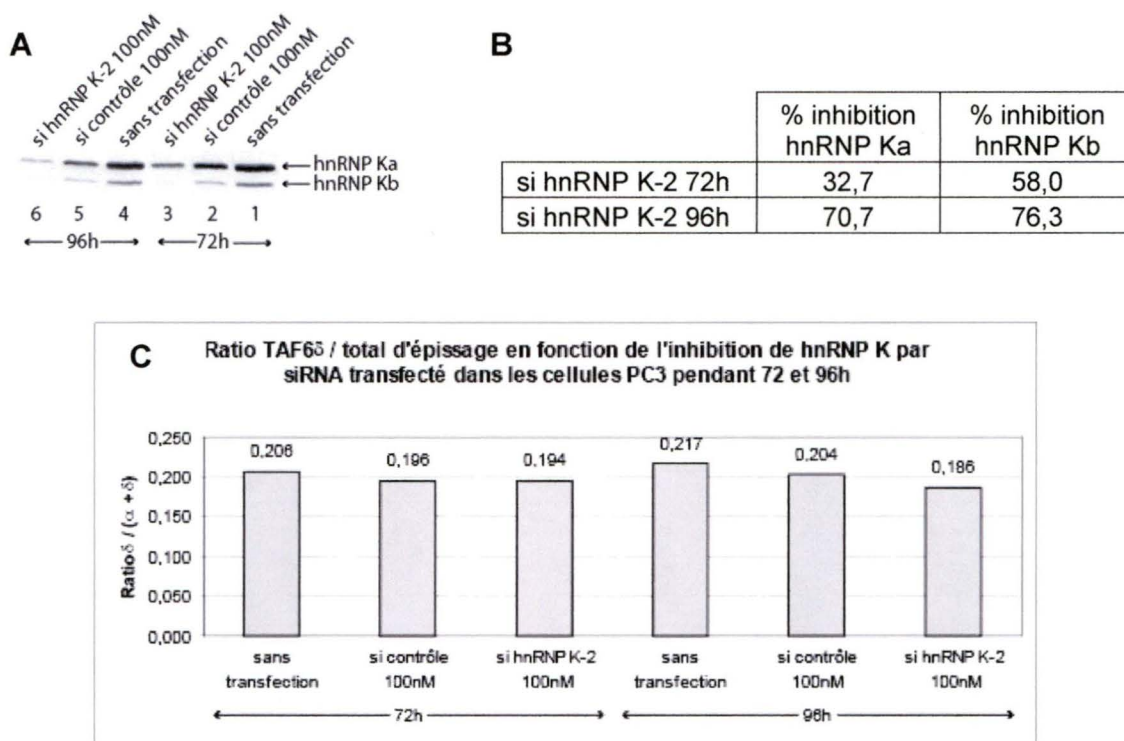
RBM10-1	--	--	--	--	0,229
RBM10-2	--	--	--	--	0,207
contrôle	--	0,174	--	0,222	--
RBM14-1	--	0,162	--	0,198	--
RBM14-2	--	0,197	--	0,222	--
contrôle	0,196	0,201	--	0,199	--
RBM25-2	--	0,201	--	0,202	--
RBM25-3	0,178	--	--	--	--
RBM25-4	0,175	0,188	--	--	--
contrôle	0,225	--	--	0,201	--
RBMS1-1	0,247	--	--	0,208	--
RBMS1-2	0,270	--	--	0,206	--
contrôle	0,181	--	0,212	--	--
RBPMs-1	0,167	--	0,215	--	--
RBPMs-2	0,200	--	0,202	--	--
contrôle	0,225	--	--	--	--
RNPS1-1	0,196	--	--	--	--
RNPS1-2	0,220	--	--	--	--
contrôle	0,173	0,207	0,215	0,232	0,207
RPL22/DHD5-1	0,182	0,183	0,218	0,236	0,206
RPL22/DHD5-2	0,198	0,177	0,215	0,223	0,197
contrôle	0,173	0,207	0,215	0,232	--
RPN1-1	0,196	0,196	0,220	0,233	--
RPN1-2	0,194	0,177	0,226	0,220	--
contrôle	0,172	0,174	0,209	--	--
SAFB-1	0,170	0,173	0,219	--	--
SAFB-2	0,170	0,159	0,215	--	--
contrôle	--	--	--	0,232	--
SF1-1	--	--	--	0,208	--
SF1-2	--	--	--	0,242	--
contrôle	--	--	0,214	--	0,208
SF3A2-1	--	--	0,205	--	0,216
SF3A2-2	--	--	0,212	--	0,226
contrôle	0,225	0,178	0,214	0,199	0,184
SF3A3-1	0,198	0,207	0,192	0,226	0,190
SF3A3-2	0,191	0,218	0,218	0,229	0,204
contrôle	0,172	0,174	0,209	0,201	--
SF3B4-1	0,157	0,172	0,219	0,202	--
SF3B4-2	0,173	0,158	0,223	0,209	--
contrôle	0,191	--	--	--	0,210
SFPQ-1	0,186	--	--	--	0,228
SFPQ-2	0,188	--	--	--	0,218
contrôle	0,160	0,174	0,214	0,215	0,227
SFRS2-1	0,151	0,161	0,187	0,223	0,192
SFRS2-2	0,168	0,181	0,175	0,227	0,185
contrôle	0,207	0,200	0,173	0,209	--
SFRS8-1	0,224	0,206	0,217	0,206	--
SFRS8-2	--	0,192	--	0,192	--
contrôle	0,166	0,154	0,214	--	--
SFRS14-1	0,152	0,176	0,207	--	--



SFRS14-2	0,144	0,203	0,207	--	--
contrôle	0,175	0,186	0,226	--	--
SFRS16-1	0,193	0,314	0,245	--	--
SFRS16-2	0,195	0,379	0,237	--	--
contrôle	0,222	--	--	0,201	0,208
SNW1-1	0,205	--	--	0,167	0,201
SNW1-2	0,160	--	--	0,217	0,184
contrôle	0,164	--	--	0,242	0,227
SRA1-1	0,169	--	--	0,240	0,188
SRA1-2	0,168	--	--	0,220	0,194
contrôle	0,191	--	--	0,201	0,219
SRPK1-1	0,180	--	--	0,208	0,208
SRPK1-2	0,203	--	--	0,197	0,207
contrôle	--	--	0,215	0,232	--
TAF15-1	--	--	0,235	0,220	--
TAF15-2	--	--	0,232	0,257	--
contrôle	--	0,200	0,173	--	--
TARBP1-2	--	0,181	0,204	--	--
contrôle	--	0,173	0,223	0,216	--
THOC1-1	--	0,196	0,213	0,236	--
THOC1-2	--	0,186	0,224	0,215	--
contrôle	--	0,165	--	--	--
TIAL1-1	--	0,180	--	--	--
TIAL1-2	--	0,178	--	--	--
contrôle	--	--	0,215	--	--
TRA2A-1	--	--	0,213	--	--
TRA2A-2	--	--	0,215	--	--
contrôle	0,164	0,158	--	--	--
U2AF1-1	0,168	0,180	--	--	--
U2AF1-2	0,165	0,171	--	--	--
contrôle	0,172	0,192	0,217	0,214	--
ZNF638-1	0,179	0,170	0,222	0,231	--
ZNF638-2	0,161	0,167	0,218	0,212	--

Plusieurs de ces inhibitions de protéines liant l'ARN et pouvant influencer l'épissage alternatif de TAF6 ont changé le ratio de TAF6 $\delta$  / total d'épissage, mais souvent les conditions pour retenir ces protéines comme facteur *trans* potentiel n'étaient pas respectées. Ainsi, certains siRNAs qui modifient le ratio TAF6 $\delta$  / total d'épissage n'étaient transfectés que dans une seule lignée cellulaire. Aussi, d'autres échantillons étaient disponibles que pour un seul des deux siRNA. Ceux qui modifiaient suffisamment le ratio TAF6 $\delta$  / total d'épissage ne démontraient pas un changement

fort ou encore aucune hypothèse de liaison à un motif présent dans TAF6 ne nous permettait de retenir cette protéine comme facteur *trans* potentiel. Nous avons donc voulu reproduire les résultats obtenus avec les siRNAs contre hnRNP K du LGFUS. Nous avons utilisé les cellules PC3, car ce sont dans ces cellules que le siRNA hnRNP K-2 semble le plus efficace.



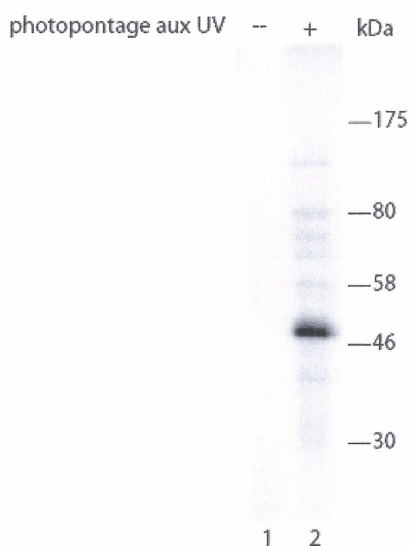
**Figure 18. Transfection du siRNA contre hnRNP K dans les cellules PC3.** A) Immunobuvardage de type Western pour la détection d'hnRNP K restant dans les cellules PC3 transfectées par le siRNA contre hnRNP K. B) Calcul du pourcentage d'inhibition des deux isoformes d'hnRNP K par quantification des bandes d'hnRNP K de l'immunobuvardage de types Western avec le logiciel ImageQuant. C) Calcul des ratios TAF6 $\delta$  / total d'épissage des RT-PCR à partir de l'ARN extrait des cellules PC3 transfectées avec le siRNA hnRNP K-2.

À la figure 18A, il est possible d'observer que l'inhibition d'hnRNP K est relativement bien accomplie dans les cellules PC3. Par contre, il faut savoir qu'il reste un peu d'hnRNP K dans les cellules et cela peut influencer le changement un peu faible du ratio TAF6 $\delta$  / total d'épissage. De plus, sur la figure 18A et 18B, deux isoformes d'hnRNP K sont identifiées, cela par souci de simplicité, car aucune



vérification avec des anticorps spécifiques à chacun des deux isoformes n'a été faite. La transfection des siRNAs contre hnRNP K n'a pas été effectuée en triplicata. Par contre, j'ai effectuée 5 transfections indépendantes et, dans tous les cas, il a été observé que le changement d'épissage est faible et reproductible.

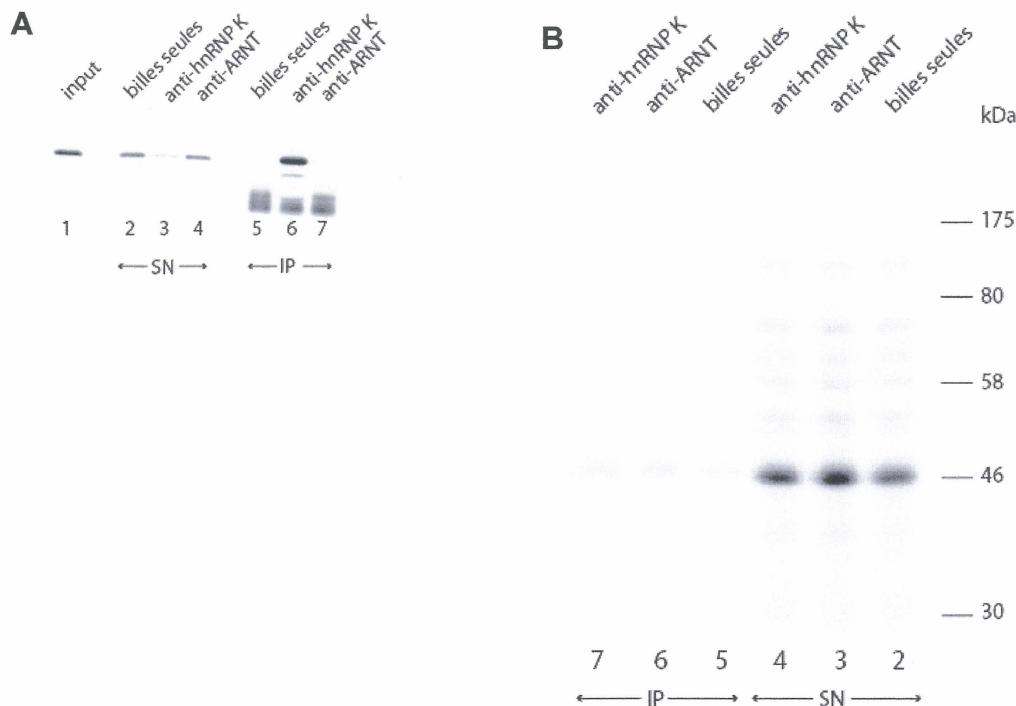
Afin de connaître la capacité de l'ARN du minigène à lier des protéines, nous avons effectué un pontage aux ultraviolets. Pour cela, nous avons produit un transcrit d'ARN radiomarké à partir du minigène TAF6, que nous avons utilisé pour l'étude des éléments *cis*, et nous l'avons mis en présence d'un extrait nucléaire de cellules HeLa ws. Par la suite, nous avons exposé cela aux ultraviolets afin de lier de façon covalente les protéines de l'extrait nucléaire sur le transcrit d'ARN radiomarké.



**Figure 19. Pontage aux ultraviolets du transcrit ARN du minigène TAF6.** Le pontage a été effectué *in vitro* à l'aide d'un transcrit ARN radiomarké du minigène TAF6 que nous avons mis en contact avec un extrait nucléaire de cellules HeLa ws. Puis, le mélange a été exposé aux ultraviolets afin de lier les protéines sur l'ARN de façon covalente. L'ARN non-lié a été digéré par la RNase A et la réaction de pontage a été dénaturée avant d'être migrée sur un gel dénaturant 10%. Le puit 1 représente la réaction de photopontage aux UV sans (-) exposition aux UV, il s'agit du contrôle négatif. Le puit 2 représente la réaction de photopontage aux UV avec (+) exposition aux UV. Une série de marqueurs de poids moléculaire (en kDa) a été migrée sur le gel avec les deux échantillons.

Le pontage de la figure 19 démontre bien la présence de protéine liant l'ARN sur le transcrit d'ARN radioactif du minigène type sauvage de TAF6. De plus, une forte bande à environ 50kDa nous permet de considérer que hnRNP K fait partie de ces protéines.

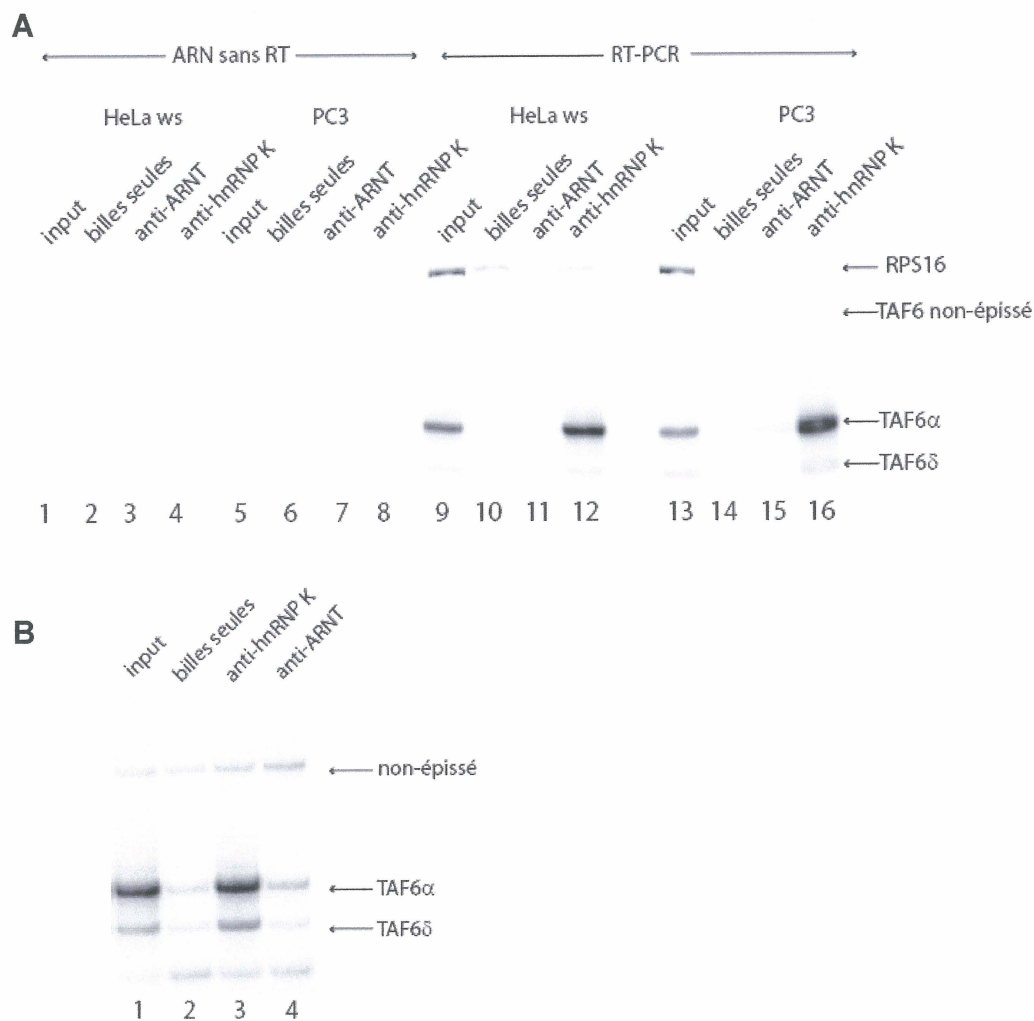
Afin d'identifier si hnRNP K est la protéine de cette bande à 50kDa, nous avons effectué une immunoprécipitation *in vitro* du pontage de l'extrait nucléaire de HeLa ws avec le transcrit d'ARN radiomarqué du minigène TAF6. Nous avons utilisé un anticorps spécifique, anti-hnRNP K afin de tenter d'immunoprécipiter le transcrit d'ARN radiomarqué de TAF6 qui pourrait être lié à la protéine hnRNP K.



**Figure 20. Pontage aux UV suivi d'une immunoprécipitation pour hnRNP K. A)**

Immunobuvardage de type western pour la vérification des paramètres de l'immunoprécipitation. Le puits 1 est l'*input*, c'est-à-dire la totalité des protéines présentes avant l'immunoprécipitation. Les puits 2 à 4, ce sont les surnageants, c'est-à-dire les protéines n'ayant pas lié les billes protéine A des immunoprécipitations, soit sans anticorps, avec un anticorps non-spécifique, ARNT, ou avec l'anticorps contre hnRNP K. Les puits 5 à 7, ce sont les immunoprécipitations, soient sans anticorps, avec un anticorps non-spécifique ou avec l'anticorps contre hnRNP K. B) Gel dénaturant 10% des ARNs dans les surnageants (puits 2 à 4) ou dans les immunoprécipitations (puits 5 à 7).

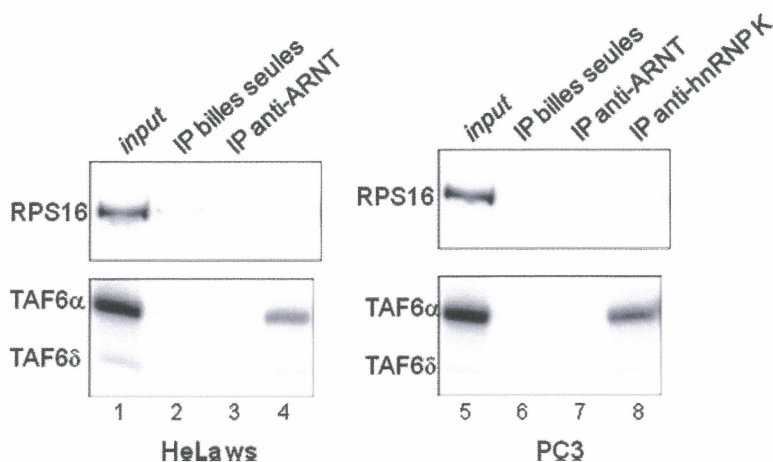
Sur la figure 20A, il est observé que les conditions d'immunoprécipitation sont optimales, car il n'y a aucun bruit de fond visible lorsque nous comparons les puits d'immunoprécipitation des contrôles, soit avec un anticorps non-spécifique (anti-ARNT) ou sans anticorps (billes seules) (figure 20A, puits 5 et 7) et un bel enrichissement d'hnRNP K dans l'immunoprécipitation avec l'anticorps contre hnRNP K (figure 20A, puits 6). Par contre, l'ARN ne montre aucun enrichissement avec l'anticorps contre hnRNP K (figure 20B, puits 5 à 7). Il est alors fort probable que la forte bande visible sur le gel dénaturant 10% de pontage aux UV ne soit pas due à la présence d'hnRNP K. Par contre, puisque les conditions de cette immunoprécipitation *in vitro* ne sont pas physiologiques, contrairement à la transfection des siRNAs dans les cellules, nous avons tenté deux autres approches afin de déterminer si hnRNP K et TAF6 interagissent en cellules.



**Figure 21. Immunoprécipitation en conditions natives et ChIP ARN.** A) Immunoprécipitation *in vivo* en conditions natives sans pontage. Les cellules HeLa ws et PC3 ont été lysées et les extraits cellulaires ont été immunoprécipités à l'aide d'un anticorps spécifique contre hnRNP K ou non-spécifique (anti-ARNT). L'ARN lié à hnRNP K a été extrait et une PCR radioactive (puits 1 à 8) ou une RT-PCR spécifique à TAF6 (puits 9 à 16) ont été effectuées. Les réactions de PCR ou de RT-PCR ont été migrées sur gel non-dénaturant 10%. B) Immunoprécipitation *in vivo* avec pontage au formaldéhyde. Les cellules HeLa ws ont été photopontées à l'aide de formaldéhyde, puis elles ont été lysées. L'extrait cellulaire photoponté a été immunoprécipité à l'aide d'un anticorps spécifique, anti-hnRNP K ou d'un anticorps non-spécifique, anti-ARNT. Le photopontage a été renversé et l'ARN lié à hnRNP K a été extrait. Une RT-PCR spécifique à TAF6 a été effectuée. Les réactions de RT-PCR ont été migrées sur gel non-dénaturant 10%.

Les deux immunoprécipitations *in vivo* avec ou sans pontage démontre un certain enrichissement de l'ARN messager de TAF6. Sur la figure 18A, le contrôle sans rétrotranscription montre qu'il reste très peu d'ADN de TAF6, grâce à la digestion à la DNase A (figure 21A, piste 1 à 8). Il existe donc un enrichissement en TAF6α et TAF6δ lors de l'immunoprécipitation avec l'anticorps contre hnRNP K, dans les deux

lignées cellulaires testées (figure 21A, pistes 12 et 16). De plus, cet enrichissement n'existe pas dans les immunoprécipitations avec l'anticorps non-spécifique, anti-ARNT (figure 21A, pistes 11 et 15), ou sans anticorps (figure 21A, pistes 10 et 14). L'ARN pré-messager de TAF6 semble aussi être enrichi dans l'immunoprécipitation avec hnRNP K, autant dans les cellules HeLa ws et PC3 (comparer les pistes 10 à 12 et 14 à 16, figure 21A).



**Figure 22. Immunoprécipitation *in vivo* en conditions natives.** Les cellules HeLa ws (puits 1 à 4) et PC3 (puits 5 à 8) ont été lysées et les extraits cellulaires ont été immunoprécipités à l'aide d'un anticorps spécifique contre hnRNP K ou non-spécifique (anti-ARNT). L'ARN lié à hnRNP K a été extrait et une RT-PCR radioactive et spécifique à TAF6 ou à RPS16 a été effectuée. Les réactions de RT-PCR ont été migrées sur gel non-dénaturant 10%.

Sur la figure 22, le contrôle de spécificité, RPS16, démontre que l'enrichissement de TAF6 avec hnRNP K est réel. Cela nous permet d'affirmer qu'il y a une interaction entre l'ARN de TAF6 et la protéine de liaison à l'ARN, hnRNP K dans les cellules HeLa ws et PC3. De plus, avec le pontage au formaldéhyde, il est visible sur la figure 18B qu'il y a plus d'ARN messager de TAF6 dans l'immunoprécipitation avec anti-hnRNP K (piste 3) qu'avec l'anticorps non-spécifique, anti-ARNT (piste 4) ou sans anticorps (piste 2). Cette deuxième approche nous permet de conclure qu'il existe une



interaction entre les ARNs des deux isoformes de TAF6 et hnRNP K dans les cellules vivantes.

### Signal d'épissage

L'expression de l'ARN messager de TAF6 $\delta$  induite lors de l'apoptose dans les cellules HL-60, suite à leur différenciation à l'aide d'acide rétinoïque (BELL, B. et al, 2001). Récemment, il a été mis en évidence que TAF6 $\delta$  possède sa propre voie apoptotique, indépendante de p53 (WILHELM, E. et al, 2008). Ainsi, il est important de connaître le signal déclenchant ce phénomène physiologique et de connaître la contribution des éléments ARN *cis* répondent à un tel signal. Nous avons effectué différents tests sur les cellules HeLa ws afin d'identifier quelles voies de régulation contrôlent le signal d'épissage alternatif de TAF6. Ces expériences sont résumées dans le tableau 5. La plupart de ces expériences sont reliées aux résultats des micropuces effectuées (WILHELM, E. et al, 2008). Le logiciel Panther (<http://www.pantherdb.org/>) a permis de faire des regroupements selon l'ontologie des gènes. À partir de ces résultats, 6 voies ont été démontrées comme étant principalement activées par TAF6 $\delta$ , soit la voie de Notch, de l'angiogénèse, de la réponse au stress oxydatif, de l'apoptose, des intégrines et de p53.

**Tableau 5. Expériences effectuées pour l'identification du signal d'épissage de TAF6 $\delta$**

Traitement	Description	Concentrations ou durée des traitements	Temps d'incubation	Résultat du test
DMEM - sérum et/ou glucose	Privation de nutriments	--	30min à 6h	--
DMEM + HEPES en hypoxie ou normoxie	Incubation à 37°C sans oxygène (CRC, laboratoire du Du Dubois)	0% O <sub>2</sub> et normoxie (~20%)	~18h	--

Acide lactique, chlorhydrique et acétique	pH du milieu de culture	pH 5,0-5,5-6,0-6,5 et 7,0	2h	--
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	Hypoxie chimique	50, 100, 500 et 1000 µM	2h	--
Antimycine A	Inhibiteur de la respiration cellulaire	10, 25, 50 et 100 µM	3h, 5h et 6h30min	--
Antimycine A + hypoxie en chambre		10 µM	~18h	
Mévastatine	Inhibiteur de la prénylation de protéines post-traductionnellement	5 et 50 µM	42h	--
Mévastatine + hypoxie en chambre		100 µM	~18h	
CoCl <sub>2</sub>	Hypoxie chimique	100, 200 et 300 µM	~18h	--
Déferoxamine mesylate	Chélation des ions ferriques	50, 100 et 150 µM	~18h	--
Tampon hypoxique (Acide borique 200mM et Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 100mM) + hypoxie en chambre	Chélation de l'oxygène et hypoxie par incubation avec CO <sub>2</sub>	10 psi et dégazage 4 x 5min	~18h	--
TGFβ	Facteur de croissance	2 ng/mL	~18h	--
DETA/NO	Donneur d'oxide nitrique	100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 µM et 1 mM	22h pour les puits de 100 à 250 µM et 5h30min pour les puits 300 µM à 1 mM	--
DETA/NO + hypoxie	Donneur d'oxide nitrique	100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 µM et 1 mM	22h pour les puits de 100 à 250 µM et 5h30min pour les puits 300 µM à 1mM	
Sorbitol	Choc hypo- et hyperosmotique	0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 et 0.9 M	2h	--
Protoporphyrin IX Zinc(II)	Inhibe l'hème oxygénase et 3 isoformes de NO synthase	1, 2.5, 5, 10, 15 et 30 µM	~18h	--
Protoporphyrin IX Zinc(II) + hypoxie		1, 2.5, 5, 10, 15 et 30 µM	20h et 48h	
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	hypoxie chimique	2 mM	14, 17, 21 et 38h	--
Ré-oxygénation après hypoxie		Hypoxie 2h	20, 40, 60, 120min et 7h	--
Tunicamycine	Inhibiteur de la glycosylation des protéines	0.5, 1.5 et 3 µg/mL	16h	--

L-NAME	Inhibe la production de NO intracellulaire	10 $\mu$ M	30h	--
L-NAME + hypoxie en chambre		10 $\mu$ M	30h	
Hemin	substrat de l'hème oxygénase	5, 15, 30 et 45 $\mu$ M	30h	--
		0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 et 10 $\mu$ M	4h	
Hemin + hypoxie en chambre		5, 15, 30 et 45 $\mu$ M	30h	
CORM-2	Facteur de relâche de monoxyde de carbone	12.5, 25, 50, 100, 500 $\mu$ M et 1 mM	2h	--
		10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 et 300 $\mu$ M	4h	
CORM-2 - hypoxie en chambre		12.5, 25 et 50 $\mu$ M	30h	
Transfection d'un plasmide exprimant HO-1 (hème oxygénase-1)	Hème oxygénase-1, enzyme de dégradation de l'hème	100, 150, 200, 250, 300, 400, 550, 700, 850, et 1000 ng	24h	--
		150 ng	0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 6, 8, 10, 12 et 24h	
		250 ng	16, 20, 24, 32 et 36h	
		5, 30, 55, 80, 105, 130, 155, 180, 205, 230, 255 et 305 ng	24h	
HO-1 + hypoxie		250 ng	24h	
HO-1 + protoporphyrin IX Zinc(II)		250 ng de HO-1 et 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 50, 100 et 200 $\mu$ M	24h	--
HO-1 + hemin		250 ng de HO-1 et 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 et 1000 $\mu$ M	24h	--
HO-1 + déferoxamine		250 ng de HO-1 et 10, 50, 100 et 200 $\mu$ M	24h	--
HO-1 + CORM-2		250 ng de HO-1 et 10, 25, 50, 100, 200 et 300 $\mu$ M	2, 4, 6, 8 et 24h	--
HO-1 + biliverdine		5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 et 100 $\mu$ M	24h	--
HO-1 + hémoglobine	Hémoglobine capte le CO intracellulaire	250 ng et 10, 50, 100 et 200 $\mu$ M	24h	--



Transfection d'un plasmide exprimant H25A	Mutation de HO-1 d'une histidine en position 25 pour une alanine	250 et 550 ng 150 ng	24h 2, 3 et 4h	--
Transfection d'un plasmide exprimant HO-2	Hème oxygénase-2	100, 300, 500 et 700 ng	24h	--
Biliverdine	Inhibe l'hème oxygénase par blocage du site de liaison du substrat sur l'enzyme	5, 20, 50 et 100 $\mu$ M	24h	--
FeSO <sub>4</sub>	Donneur d'ion Fe <sup>2+</sup>	5, 20, 50 et 200 $\mu$ M	24h	--
Gazage des HeLa ws au CO	Hypoxie	15min 5, 15, 35, 45 et 50 mL 30min 30min et 2h	5, 15, 30, 45, 60 et 120min 2h 4h 4h	--
Gazage des HeLa ws au CO + hémoglobine		200 $\mu$ M d'hémoglobine et 15min de gazage	4h	
Succinyl acétone	Inhibiteur de la synthèse d'hème	0.1, 0.5, 1, 2.5 et 5 mM 0.1, 0.5, 1, 2.5 et 5 mM	~18h 48 et 72h	--
HO-1 + succinyl acétone		250 ng de HO-1 et 2.5 mM	~18h	
Isoniazid	Inhibiteur de la synthèse d'hème	1, 5, 10, 25 et 50 mM 1, 5, 10, 25 et 50 mM	~18h 48 et 72h	--
HO-1 + isoniazid		250 ng de HO-1 et 25 mM	~18h	
Biliverdine + FeSO <sub>4</sub>		50 $\mu$ M biliverdine et 50 $\mu$ M FeSO <sub>4</sub>	4h	--
Biliverdine + CORM-2		50 $\mu$ M biliverdine et 50 $\mu$ M CORM-2	4h	--
FeSO <sub>4</sub> + CORM-2		50 $\mu$ M FeSO <sub>4</sub> et 50 $\mu$ M CORM-2	4h	--
Biliverdine + FeSO <sub>4</sub> + CORM-2		50 $\mu$ M de chaque produit	4h	--
Glutamate	augmente la production de CO intracellulaire	0.5, 0.8, 1, 2.5, 5 et 10 $\mu$ M	4h	--
Hémoglobine	capte le CO intracellulaire	200 $\mu$ M	4h	--

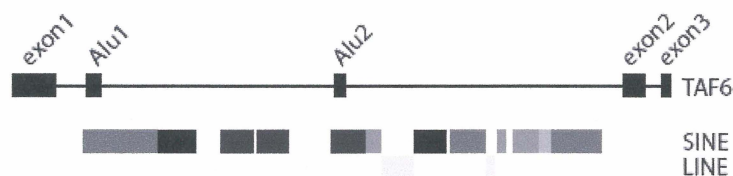
L'antimycine A, la mévastatine, le CoCl<sub>2</sub>, le deferoxamine mesylate, le DETA/NO, la protoporphyrin IX (Zinc (II)), le Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, la tunicamycine, le L-NAME, le CORM-2, le succinyl acétone, l'isoniazid et l'hémoglobine proviennent de chez Sigma-Aldrich. Le DMEM provient de chez Wisent. Les acides lactique, chlorhydrique et acétique ainsi que NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O et le FeSO<sub>4</sub> proviennent de chez Fisher Scientific. La bonbonne de monoxyde de carbone provient de chez Praxair. Le TGF $\beta$  provient du

laboratoire du Dr Claire Dubois. Le glutamate ainsi que le sorbitol proviennent du laboratoire du Dr Raymund Wellinger. La biliverdine provient de chez MP Biomedicals. L'hémé a été acheté chez Fluka. Le plasmide pcDNA3.1/Zeo.CMV.Flag.hHO-1 a été donné par le laboratoire du Dr Hyman Schipper. Le plasmide HO-2 a été donné par le laboratoire du Dr Phillis A. Dennery.

Toutes les expériences pour le signal d'épissage sont reliées à la voie de l'hypoxie qui est sous-jacente à 5 des 6 voies activées par TAF6 $\delta$ , soient aux voies de Notch, de l'angiogénèse, de la réponse au stress oxydatif, de l'apoptose et de p53. Les résultats négatifs de toutes ces expériences ne nous permettent pas de mettre en évidence un rôle pour cette voie dans l'épissage alternatif de TAF6 $\delta$ .

### Éléments répétitifs *Alus*

Les éléments répétitifs sont souvent associés à certaines maladies, incluant le cancer. Il a été démontré qu'il y a augmentation de l'expression de TAF6 dans les cancers du sein inflammatoires (DRESSMAN, H.K. et al, 2006), ainsi qu'il y a inclusion des éléments répétitifs *Alus* dans les cellules tumorales du sein (WANG, W. et al, 2004) Il est donc important de définir la base moléculaire de l'inclusion des éléments *Alus* dans l'ARN messager de TAF6 pour éventuellement comprendre leur impact dans le cancer du sein.



**Figure 23. Clone de 5 485 paires de bases de TAF6.** Ce nouveau clone comprend les exons 1, 2 et 3 ainsi que les introns entre ces exons. Les éléments répétitifs *Alus* se retrouvent dans l'intron entre les exons 1 et 2. Les éléments répétitifs SINE (*short interspersed nuclear elements*), comprend les *Alus*, et LINE (*long interspersed nuclear elements*) sont indiqués sous la séquence de TAF6.

Des deux répétitions *Alus* présentes dans le gène TAF6, *Alu1* est le plus fréquent à 8,89% dans les ESTs disponibles sur le site d'UCSC Genome Bioinformatics

(<http://genome.ucsc.edu/>), tandis que *Alu2* est plus rare à 1,11%. Ils sont donc présents dans 10% des ESTs connus de TAF6. Nous avons donc cloné une partie du gène de TAF6 qui comprend les exons 1 à 3 (voir figure 23) à partir d'un clone bactérien artificiel (BAC, Invitrogen) qui représente le gène normal et à partir d'ADN génomique de HeLa ws qui représente les mutations subies par le gène dans des cellules cancéreuses métastatiques. Le séquençage des deux clones a permis de montrer que le gène amplifié à partir du BAC ne présente aucune mutation par rapport à la séquence attendue de TAF6 (obtenue par PCR in silico sur le site d'UCSC Genome Bioinformatics). Pour l'*Alu1* amplifié de l'ADN génomique de HeLa ws, toutes les mini-préparations d'ADN ne présentent pas de mutation dans la séquence de l'*Alu1* de TAF6.

```

00000001 gcaagtgtgccactttaattttttttgttttttttttgagacagggttt 00000050
<<<<<<<< |||||  <<<<<<<<
99554253 gcaagtgtgccactttaattttttttgttttttttttgagacagggttt 99554204

00000051 ccgtctgttaccaggctgttgtgcagtggcaccatcttggctcactgca 00000100
<<<<<<<< |||||  <<<<<<<<
99554203 ccgtctgttaccaggctgttgtgcagtggcaccatcttggctcactgca 99554154

00000101 gcctccaactcctcagttcaagcgatcctcctgcctcagcctcctaagta 00000150
<<<<<<<< |||||  <<<<<<<<
99554153 gcctccaactcctcagttcaagcgatcctcctgcctcagcctcctaagta 99554104

00000151 gctgggatgacagggttcacaccaccagggtccgtctaattttttaattttt 00000200
<<<<<<<< |||||  <<<<<<<<
99554103 gctgggatgacagggttcacaccaccagggtccgtctaattttttaattttt 99554054

```

**Figure 24. Alignement de séquence pour l'*Alu1*.** Séquences obtenues pour l'*Alu1* de TAF6 à partir de la PCR in silico sur le site d'UCSC Genome Bioinformatics et du séquençage de cet *Alu* sur l'ADN génomique de HeLa ws. L'alignement a été fait sur le site d'UCSC Genome Bioinformatics entre la séquence des HeLa ws (séquence 00000001 à 00000200) et la séquence supposée par PCR in silico (99554054 à 99554253). L'*Alu1* est indiquée en bleu.

Le séquençage de cet *Alu* nous a permis de l'identifier comme un *Alu-J*, il fait donc partie de la plus vieille famille des *Alus* et se trouve dans le sens + (figure 24). Par



contre, pour l'*Alu2* amplifié de l'ADN génomique de HeLa ws, certaines des mini-préparations séquencées présentent une mutation ponctuelle au niveau de l'*Alu2*.

```

00000001 ttctgtctgttttttttgttgttgttgttgttgttgttttgagaagaagtctt 00000050
<<<<<<<< |||||  <<<<<<<<
99552235 ttctgtctgttttttttgttgttgttgttgttgttgttttgagaagaagtctt 99552186

00000051 gctttgttgcccaggctggagtgcaatgacacagatctttgctcactgca 00000100
<<<<<<<< |||||  <<<<<<<<
99552185 gctttgttgcccaggctggagtgcaatgacacagatctttgctcactgca 99552136

00000101 acctccgcctcccgggttcgagtgattcttctgcctcagcctcccagagta 00000150
<<<<<<<< |||||  <<<<<<<<
99552135 acctccgcctcccgggttcgagtgattcttctgcctcagcctcccagagta 99552086

00000151 gctgtgattacaggtgcccgccaccatgcccatctaatttttttattttt 00000200
<<<<<<<< |||||  <<<<<<<<
99552085 gctgtgattacaggtgcccgccaccatgcccatctaatttttttattttt 99552036

00000201 agtagagatagggtttcaccatggttgccaggctggtcttgaactcctga 00000250
<<<<<<<< |||||  <<<<<<<<
99552035 agtagagatagggtttcaccatggttgccaggctggtcttgaactcctgc 99551986

00000251 cctcaagtgatccgcccaccttcgtctcccaaagtgctaggattacaggc 00000300
<<<<<<<< |||||  <<<<<<<<
99551985 cctcaagtgatccgcccaccttcgtctcccaaagtgctaggattacaggc 99551936

```

**Figure 25. Alignement de séquence pour l'*Alu2*.** Séquences obtenues pour l'*Alu2* de TAF6 à partir de la PCR in silico sur le site d'UCSC Genome Bioinformatics et du séquençage de cet *Alu* sur l'ADN génomique de HeLa ws. L'alignement a été fait sur le site d'UCSC Genome Bioinformatics entre la séquence des HeLa ws (séquence 00000001 à 00000300) et la séquence supposée par PCR in silico (99551936 à 99552235). L'*Alu2* est indiquée en bleu et la mutation ponctuelle en vert.

Le séquençage de cet *Alu* nous a permis de savoir qu'il se trouve dans la famille *Alu-Sx* et se trouve dans le sens + (figure 25). Cette mutation ponctuelle consiste en une cytosine mutée pour une adénosine. Pour l'instant, nous n'avons pas encore tenté d'utiliser cette mutation dans le contexte d'un plasmide afin de voir s'il existe une différence entre l'*Alu2* normal et mutant.

## **DISCUSSION ET CONCLUSION**

### **Éléments *cis***

L'objectif de cette partie était d'identifier les éléments *cis* influençant l'épissage alternatif de TAF6. Nous avons commencé par vérifier la capacité de notre minigène clone de TAF6 à reproduire le profil d'épissage du TAF6 endogène. Mes résultats ont permis d'identifier le point de branchement de TAF6 et de déterminer que la force relative des deux sites 5' d'épissage est importante lors du choix de ce site d'épissage. De plus, en créant une séquence riche en pyrimidine, meilleur site d'attachement pour U2 snRNP, nous pouvons observer un épissage plus efficace. Cela nous permet d'affirmer que le site 3' d'épissage n'est pas un site fort (figure 8).

Par la suite, nous avons effectué des analyses et choisi d'introduire des mutations basés sur des critères de conservation entre les espèces et la présence de sites de liaison potentiels pour différentes protéines. Plusieurs des mutants créés n'ont pas changé l'épissage, excluant que ces séquences conservées aient un rôle dans le contrôle de l'épissage alternatif de TAF6.

Dans la première zone, nous avons fait quatre mutants (figure 9). Deux de ces quatre mutants, soit ex2\_2 et ex2\_4, ont provoqué un changement d'épissage significatif vers TAF6 $\alpha$ . Il est donc fort possible que deux sites activateurs d'épissage soient présents à ces endroits. Une distance de 10 nucléotides est présente entre les deux sites, ainsi, il se pourrait qu'il s'agisse d'un seul et même élément *cis*.

La deuxième zone comprend toute la partie alternative de l'exon 2 (figure 10). Trois mutations de 10 nucléotides ont permis de déterminer l'importance de la distance de 30 nucléotides entre les deux sites 5' d'épissage. Cette distance lorsque

modifiée entraîne un changement d'épissage qui favorise TAF6 $\delta$ . Par contre, en condition normale, cette distance entraîne l'épissage d'une quantité majoritaire de TAF6 $\alpha$ . De plus, dans la partie 5' de cet exon alternatif, un site activateur d'épissage est présent et sa mutation entraîne un plus grand épissage alternatif de TAF6 $\delta$ . Lors de la mutation d'une adénosine de la partie 3' de l'exon alternatif en guanosine, nous avons pu constater la modification possible de la structure secondaire de l'ARN de TAF6 (figure 11). Afin de tenter de confirmer cette hypothèse, nous avons effectué des mutations complémentaires qui ont renforcé l'idée d'une structure secondaire et exclu une protéine pouvant possiblement lier à cet endroit. La littérature contient plusieurs précédents qui soutiennent le rôle de la structure secondaire des ARNs pré-messagers dans l'épissage. En 1988, des expériences d'épissage *in vitro* avec le gène de la  $\beta$ -globine de souris, le groupe du Dr Ian Eperon a démontré que la présence d'une structure secondaire pouvait empêcher l'épissage et que, de plus, de petites structure de type tige-boucle pouvait influencer sur le choix du site 5' d'épissage *in vivo* si la taille de la boucle n'est pas trop grande (EPERON, L.P. et al, 1988).

Dans la troisième zone, cinq mutations ont été exécutées (figure 14). Deux d'entre elles ont modifiés de façon notoire l'épissage alternatif de TAF6. La mutation d'une cytosine, fortement conservée en thymidine entraîne un épissage plus fort de TAF6 $\alpha$ . Il s'agit donc d'un autre nucléotide important dans le choix du site 5' d'épissage. Par contre, nous ne savons pas s'il s'agit d'un nucléotide important pour l'attachement d'une protéine à l'ARN ou encore d'une autre modification de structure secondaire. La mutation d'un motif polyC près du centre de l'intron mène à un fort épissage de TAF6 $\alpha$ . Cela permet d'envisager l'éventualité de la liaison d'une protéine

de la famille PCBP (*polyC binding protein*) qui comporte quatre membres ou encore de hnRNP K qui peut lier les motifs polyC. La démonstration de la capacité de hnRNP K à lier les séquences riches en cytosines a été démontrée au départ par des expériences d'immunoprécipitation avec billes Sepharose liées à homopolymère polyC (SWANSON, M.S. et DREYFUSS, G., 1988). Puis, par des expériences de SELEX, il a été mis en évidence que la séquence consensus de liaison d'hnRNP K est 5'-UC<sub>3-4</sub>(U/A)<sub>2</sub>-3' (THISTED, T. et al, 2001).

La quatrième zone est constituée de la fin de l'intron (figure 15). Deux mutations ont été créées pour cette zone et aucune n'a donné de changement significatif de l'épissage alternatif de TAF6.

Finalement, les doubles mutants et le triple mutant (figure 16) n'ont pas tous démontré de changement au niveau de l'épissage alternatif de TAF6. Par contre, le 2ko a montré un changement significatif de l'épissage alternatif et est composé de mutations qui, individuellement, ne modifient pas le patron d'épissage alternatif de TAF6. Cela permet de supposer qu'il existe des sites coopératifs et dont seule la mutation de tous ces sites coopératifs pourrait donner un effet sur le patron d'épissage alternatif de TAF6.

### **Facteurs *trans***

Nous avons utilisé des échantillons d'ADNc de cellules transfectées par des siRNAs contre différentes protéines de liaison à l'ARN produits par le LGFUS. L'analyse de ces échantillons pour TAF6 ainsi que les résultats des mutations nous ont permis de supposer une liaison entre hnRNP K et TAF6. Nous avons donc refait ces expériences avec un siRNA contre hnRNP K transfecté dans les cellules PC3.

Cela nous a permis de retrouver le changement d'épissage que nous avons observé avec les échantillons du LFGUS. Le changement d'épissage dû à l'inhibition de hnRNP K par le siRNA est faible, mais reproductible. Il est possible qu'une réduction dans la quantité de hnRNP K (environ 30%) provoque un effet. Il est aussi possible que les protéines de liaison au polyC ait des fonctions similaires et, ainsi, par redondance, les effets de l'inhibition de hnRNP K soient moins importants, car ces protéines peuvent remplacer fonctionnellement hnRNP K et, donc, le changement d'épissage demeure faible. Par ailleurs, il a déjà été démontré que hnRNP K peut influencer sur l'épissage. La liaison de hnRNP K à une séquence polyC d'un ISE (*intronic splicing enhancer*) de l'ARN pré-messager de la  $\beta$ -tropomyosine de poulet entraîne l'épissage de l'exon 6A (EXPERT-BEZANÇON, A. et al, 2002). De plus, une récente étude démontre que hnRNP K est un effecteur bidirectionnel, car il promeut autant l'exclusion d'exon (exon cassette) que l'inclusion d'exons sur une grande variété d'évènement d'épissage (VENABLES, J.P. et al, 2008).

Le pontage aux ultraviolets a montré la liaison de protéines au niveau de l'ARN transcrit à partir du minigène TAF6 utilisé pour faire les mutations. Lors de ces expériences, nous avons fait migrer une série de marqueurs de poids moléculaire en même temps que les échantillons et nous avons pu constater qu'une des protéines pontées du gel a la même taille que hnRNP K. Nous avons voulu identifier si la protéine dans cette bande de 50kDa était hnRNP K et nous avons tenté une immunoprécipitation de hnRNP K. En premier lieu, nous avons défini nos conditions d'immunoprécipitation et vérifié celles-ci par immunobuvardage de type western. Ainsi, nous avons pu démontrer que les conditions utilisées étaient optimales, car la protéine hnRNP K n'était présente que dans l'immunoprécipitat avec l'anticorps



contre hnRNP K. Par la suite, nous avons fait la même expérience, mais cette fois, nous avons pu constater que la protéine pontée à 50kDa n'est pas hnRNP K. Puisque cette immunoprécipitation ne permet pas de voir une interaction entre l'ARN pré-messager de TAF6 et la protéine hnRNP K, nous avons voulu reprendre les immunoprécipitations avec des conditions plus physiologiques.

Nous avons donc expérimenté avec deux autres techniques d'immunoprécipitation *in vivo*, soit l'immunoprécipitation en conditions natives et l'immunoprécipitation avec pontage au formaldéhyde (ChIP ARN). La technique d'immunoprécipitation *in vivo* en conditions natives a été tirée de l'article de Klimek-Tomczak, K. et al (2004). A la figure 21A, il est possible d'observer qu'il y a eu enrichissement de l'ARN messager de TAF6 dans l'immunoprécipitat avec l'anticorps contre la protéine hnRNP K. Par contre, le contrôle de l'ARN sans transcription inverse démontre qu'il est possible qu'une contamination par de l'ADN non digéré après le traitement à la DNase A amène l'amplification des ARNs messagers de TAF6. Toutefois, cette contamination est très faible et, ainsi, nous concluons qu'une interaction entre les ARNs messagers des isoformes de TAF6 et la protéine hnRNP K se produit *in vivo*. Par contre, l'ARN pré-messager de TAF6 visible dans ces expériences est très variable. Ainsi, puisqu'il s'agit d'une espèce transitoire en cellule, il faudrait donc un pontage afin de déterminer si la liaison de hnRNP K avec l'ARN pré-messager de TAF6 s'effectue, ce qui pourrait potentiellement confirmer l'interaction de hnRNP K avec l'intron 2 de TAF6. Le ChIP ARN est une technique aussi tirée d'un article, celui-là d'Evans, J.R. et al (2003). Le ChIP ARN utilise un pontage au formaldéhyde qui permet de fixer de façon covalente les protéines sur les ARNs avec lesquels ils interagissent. A la figure

18B, nous pouvons voir un enrichissement des ARNs messagers de TAF6 par rapport à l'*input* et aux contrôles sans ou avec anticorps non-spécifique (anti-ARNT). Ce résultat, en combinaison avec celui de l'immunoprécipitation *in vivo* sans pontage, permet de conclure à l'interaction réelle entre l'ARN messenger de TAF6 et hnRNP K dans les cellules vivantes. Dans cette expérience, par contre, nous ne voyons aucun enrichissement du pré-messenger de TAF6, contrairement, à l'immunoprécipitation *in vivo* sans pontage au formaldéhyde qui présente un enrichissement visible en ARN pré-messenger de TAF6 (figure 21A).

### **Signal d'épissage**

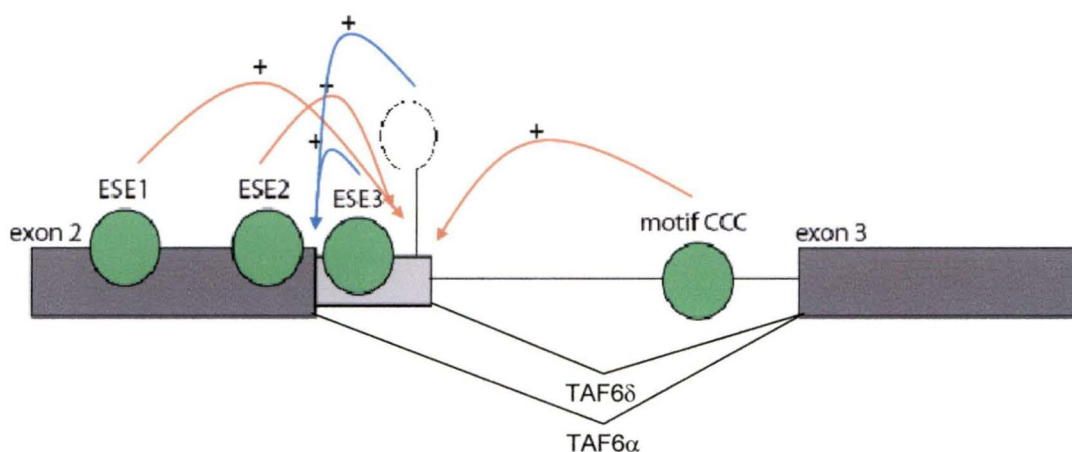
TAF6 $\delta$  a été découvert lors d'expériences sur la différenciation des HL-60 par de l'acide rétinoïque en 2001 (BELL, B. et al, 2001). Dans l'article de Wilhelm, E. et al (2008), il a été démontré que TAF6 $\delta$  active plusieurs gènes et des recoupements effectués à l'aide du logiciel Panther ont permis de démontrer que ces gènes peuvent être regroupés sous 6 voies majeures. Ces 6 voies sont les voies de Notch, de l'angiogénèse, de la réponse au stress oxydatif, des intégrines, de l'apoptose et de p53. Ils ont aussi démontré que l'apoptose induite par TAF6 $\delta$  est indépendante de p53, mais il n'en demeure pas moins que la voie d'apoptose par TAF6 $\delta$  peut être adjacente à celle de p53 et interagir avec le gardien du génome. De plus, ces 6 voies majeures présentent une grande quantité d'hypothèses dû au fait que plusieurs voies sont sous-jacentes à ces voies et que plusieurs gènes y sont impliqués. Ainsi, l'hypoxie est une voie sous-jacente à 5 des 6 voies trouvées, c'est-à-dire, à la voie de Notch, de l'angiogénèse, de la réponse au stress oxydatif, de l'apoptose et de p53. Nous avons débuté en expérimentant différentes conditions où l'hypoxie a été

démontrée comme activée lors de l'utilisation de certains produits chimiques (mévastatine, protoporphyrin IX (Zinc (II)), et ainsi de suite) ou de certaines conditions sans oxygène (incubation en présence de CO, gazage de cellules, ...). Toutes les expériences effectuées jusqu'à présent avaient un lien avec la réponse au stress hypoxique. Tout cela nous a permis d'infirmer cette hypothèse selon laquelle l'hypoxie déclencherait l'épissage alternatif de TAF6δ.

### **Éléments répétitifs *Alus***

Selon WANG, W. et al (2004), il y aurait augmentation de l'inclusion des éléments répétitifs *Alus* de TAF6 dans le cancer du sein. De plus, plusieurs articles indiquent aussi que la présence d'éléments *Alus* dans les transcrits empêcherait leur bonne expression et, ainsi, ces inclusions dans les transcrits seraient associées à des pathologies, en particulier, le cancer. Il a été démontré que, dans le cancer du sein, il y aurait augmentation de la présence de TAF6 (DRESSMAN, H.K. et al, 2006). Nous voulions donc démontrer la présence des *Alus* dans TAF6 et, si possible, éclaircir la fonction de ces *Alus* dans les transcrits de TAF6 et leur lien avec le cancer du sein. Deux éléments répétitifs *Alus* sont présents dans le gène de TAF6, le premier situé tout près du premier exon est un *Alu-J* et se trouve dans le sens +. Le deuxième est un *Alu-Sx* se retrouve près du centre de l'intron entre l'exon 1 et l'exon 2 et est dirigé dans le sens +. Nous avons identifié ces deux *Alus* à l'aide des ESTs disponibles sur le site d'UCSC Genome Bioinformatics et séquencés ces éléments à partir d'amplification d'un BAC (clone du gène normal) et de cellules HeLa ws qui sont des adénocarcinomes épithéliaux du col de l'utérus. Ceux amplifiés par le BAC ne démontrent aucune différence avec la séquence donnée par la PCR in silico de TAF6

sur le site d'UCSC Genome Bioinformatics. Par contre, le deuxième *Alu* amplifié sur les cellules HeLa ws nous a permis d'identifier une mutation ponctuelle d'une cytosine en adénosine. Cette mutation pourrait entraîner des changements d'acide aminé ou encore un changement du cadre de lecture, ce qui pourrait modifier l'expression de TAF6. Pour l'instant, nous n'avons pas encore testé l'effet de cette mutation ponctuelle.



**Figure 26. Modèle de la régulation de l'épissage alternatif obtenu par les résultats pour les mutations sur le minigène TAF6.** Des 3 ESEs identifiés, 2 favorisent l'épissage de TAF6 $\alpha$  et un favorise l'épissage de TAF6 $\delta$ . De plus, un motif CCC dans l'intron pousse l'épissage de TAF6 $\alpha$ . L'introduction d'une structure secondaire dans la partie alternative de l'exon 2 favorise l'épissage de TAF6 $\delta$ .

En conclusion, nous avons identifié plusieurs éléments *cis* qui influencent l'épissage alternatif de TAF6. Trois sites activateurs d'épissage (ESE) seraient présents : deux dans la partie constitutive de l'exon 2 et un dans la partie alternative de l'exon 2. De plus, la partie alternative a révélé la présence d'une structure secondaire importante dans le choix du site 5' d'épissage alternatif, car sa mutation entraîne l'inversion du patron d'épissage de TAF6. La distance entre les deux sites 5' alternatif est importante, car toute modification de cette distance favorise l'épissage

de TAF6 $\delta$ . La mutation en sites consensus des deux sites 5' d'épissage a permis de démontrer que c'est la force relative de ces deux sites qui détermine le choix de ce site dans l'épissage alternatif. Un motif polyC dans l'intron favorise l'épissage alternatif de TAF6 $\alpha$  lorsqu'il est muté et, ainsi, il révèle qu'une protéine peut se lier à cet endroit et influencer l'épissage alternatif de TAF6.

Par la suite, nous avons voulu identifier les facteurs *trans* se liant aux éléments *cis* trouvés. Le criblage d'échantillons d'ADNc fournis par le LGFUS et les résultats des mutations ont justifié les essais avec la protéine de liaison à l'ARN, hnRNP K qui lie les séquences riches en cytosines. Les essais avec un siRNA contre hnRNP K ont démontré que son inhibition entraîne l'épissage de TAF6 $\alpha$ . Le changement est faible, mais la possible redondance des protéines de liaison aux polyC est probable et, de plus, il reste quand même une certaine quantité de hnRNP K dans les cellules après la transfection pour 96 heures du siRNA. L'utilisation du pontage aux ultraviolets a confirmé la présence de protéines de liaison à l'ARN sur l'ARN de TAF6. Par contre, les différentes techniques d'immunoprécipitation n'ont pas pu établir clairement l'interaction directe ou indirecte entre hnRNP K et l'ARN de TAF6, mais nous ont permis d'apprendre qu'il est fort probable que hnRNP K ne se lie pas à l'ARN pré-messager, mais à l'ARN messager. Cela nous permet d'émettre l'hypothèse que cette protéine se lie ailleurs sur le gène de TAF6 qu'au niveau de l'intron séparant les exons 2 et 3. Il serait intéressant de continuer à expérimenter différentes protéines de liaison à l'ARN pour identifier les autres facteurs *trans*. L'amélioration des protocoles pour l'immunoprécipitation de hnRNP K et de l'ARN de TAF6 pourrait démontrer hors de tout doute, l'interaction directe ou indirecte entre cette protéine de l'ARN de TAF6.

Nous avons envisagé plusieurs possibilités afin de découvrir le signal qui entraîne l'épissage alternatif de TAF6 $\delta$ . Malheureusement, l'hypothèse de la réponse au stress hypoxique ne semble pas être cette voie. Ainsi, 5 des 6 voies enclenchées par la présence de TAF6 $\delta$  dans le complexe de transcription TFIID ont été indirectement vérifiées. La seule voie qui n'était pas touchée par cette supposition est la voie des intégrines et il serait intéressant de la tester. De plus, la perturbation du cytosquelette par le bris de l'interaction des intégrines entre les cellules entraîne une mort apoptotique appelée anoïkose (CHIARUGI, P. et GIANNONI, E., 2008).

L'amplification par PCR des éléments répétitifs *Alus* a démontré que les deux *Alus* présents dans le gène de TAF6 sont de la famille *Alu-J* et *Alu-Sx*, respectivement. Ces deux éléments sont présents dans les ESTs disponibles à 8,89% et 1,11%, respectivement. L'*Alu-J* ne présente aucune mutation dans l'ADN génomique des cellules HeLa ws, tandis que l'*Alu-Sx* présente une mutation ponctuelle d'une cytosine en adénosine. Par contre, nous ne savons pas encore ce que cette mutation modifie dans l'expression génique de TAF6. Il reste donc à tester l'impact fonctionnel de cette mutation sur l'inclusion de l'*Alu-Sx* dans l'ARN messager de TAF6. Le plasmide contenant toute la région 5' du gène de TAF6 développé au cours de cette étude permettra d'étudier l'importance de cette mutation rapidement. A plus long terme, cela permettra de déterminer l'implication de cette mutation ponctuelle sur l'expression et l'augmentation de TAF6 dans les cancers du sein.

J'ai présenté dans ce mémoire les conclusions tirées d'une étude portant sur l'épissage alternatif de TAF6 et démontrant, pour la première fois, les éléments *cis* contrôlant l'expression d'un isoforme pro-apoptotique de ce co-facteur de

transcription. En collaboration avec le LGFUS, nous avons pu tester près de 75 protéines de liaison à l'ARN. Cela nous a permis d'exclure plusieurs d'entre elles comme facteurs trans potentiels, mais nous avons pu déterminer que l'une d'entre elle, hnRNP K, interagit avec l'ARN messenger de TAF6. Nous n'avons pas pu déterminer le signal apoptotique d'épissage qui régule l'épissage alternatif de TAF6. Nous avons pu exclure certaines hypothèses, mais d'autres restent à vérifier. La présence de TAF6 et l'inclusion d'éléments répétitifs *Alus* dans les cancers du sein nous ont poussés à étudier ces éléments répétitifs. Nous avons pu localiser une mutation ponctuelle présente dans les cellules d'adénocarcinomes épithéliaux du col de l'utérus, HeLa ws, mais pas dans la séquence obtenue d'un clone artificiel.



## **REMERCIEMENTS**

Tout d'abord, je voudrais remercier le Dr Brendan Bell pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir confié ces projets très intéressants. J'ai beaucoup apprécié toute la disponibilité dont il a fait preuve et tous les conseils et discussions que nous avons pu avoir. Je voudrais aussi remercier Emmanuelle Wilhelm pour tout le soutien technique et les discussions avec ou sans rapport avec la science. J'aimerais remercier le LGFUS sous la direction du Dr Sherif Abou Elela, particulièrement, le Dr Roscoe Klinck et Ulrike Froelich pour les échantillons d'ADNc. Je voudrais aussi exprimer ma gratitude à mes proches qui m'ont soutenu et encouragée tout au long de ma maîtrise. Finalement, je voudrais remercier le Dr Benoit Chabot et toute son équipe, pour tout le soutien durant ce projet. Je tiens aussi à remercier Dr François Bachand, Dr Roscoe Klinck et Dr Benoit Chabot pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

## RÉFÉRENCES

- ALBRIGHT, S.R. et TJIAN, R., *TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas*, Gene, volume 242, 2000, p.1-13.
- ALLEMAND, E., GUIL, S., MYERS, M., MOSCAT, J., CÀCERES, J.F. et KRAINER, A.R., *Regulation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 transport by phosphorylation in cells stressed by osmotic shock*, PNAS, volume 102, numéro 10, 8 mars 2005, p. 3605-3610.
- ASHKENAZI, A., *Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer*, Cytokines & Growth Factor Reviews, volume 19, 2008, p. 325-331.
- AVIEL-RONEN, S., COE, B.P., LAU, S.K., DA CUNHA SANTOS, G., ZHU, C.Q., STRUMPF, D., JURISICA, I., LAM, W.L. et TSAO, M.S., *Genomic markers for malignant progression in pulmonary adenocarcinoma with bronchioloalveolar features*, PNAS, volume 105, numéro 29, 22 juillet 2008, p. 10155-10160.
- BEHRENS, S.E. et LÜHRMANN, R., *Immunoaffinity purification of a [U4/U6.U5] tri-snRNP from human cells*, Genes & Development, volume 5, 1991, p. 1439-1452.
- BELL, B., SCHEER, E. et TORA, L., *Identification of hTAF<sub>II</sub>80 $\delta$  links apoptosis signalling pathways to transcription factor TFIID function*, Molecular Cell, volume 8, septembre 2001, p. 591-600.
- BERECZKI, O., UJFALUDI, Z., PARDI, N., NAGY, Z., TORA, L., BOROS, I.M. et BALINT, E., *TATA binding protein associated factor 3 (TAF3) interacts with p53 and inhibits its function*, BMC Molecular Biology, volume 9, numéro 57, 12 juin 2008.
- BHATTACHARYA, S., TAKADA, S. et JACOBSON, R.H., *Structural analysis and dimerization potential of the human TAF5 subunit of TFIID*, PNAS, volume 104, numéro 4, 23 janvier 2007, p. 1189-1194.
- BIRCK, C., POCH, O., ROMIER, C., RUFF, M., MENGUS, G., LAVIGNE, A.C., DAVIDSON, I. et MORAS, D., *Human TAF(II)28 and TAF(II)18 interact through a histone fold encoded by atypical evolutionary conserved motifs also found in the STP3 family*, Cell, volume 94, numéro 2, 24 juillet 1998, p. 239-249.
- BLANCHETTE, M. et CHABOT, B., *A highly stable duplex structure sequesters the 5' splice site region of hnRNP A1 alternative exon 7B*, RNA, volume 3, 1997, p. 405-419.

- BLANKENBERG, F.G., *In vivo detection of apoptosis*, The Journal of Nuclear Medicine, volume 49, numéro 6(supp.), juin 2008, p. 81S-95S.
- BLENCOWE, B.J., *Alternative splicing: New insights from global analyses*, Cell, volume 126, 14 juillet 2006, p. 37-47.
- BOATRRIGHT, K.M., RENATUS, M., SCOTT, F.L., SPERANDIO, S., SHIN, H., PEDERSEN, I.M., RICCI, J.E., EDRIS, W.A., SUTHERLIN, D.P., GREEN, D.R. et SALVESEN, G.S., *A unified model for apical caspase activation*, Molecular Cell, Volume 11, février 2003, p. 529-541.
- BORUKHOV, S. et NUDLER, E., *RNA polymerase : the vehicle of transcription*, Trends in Microbiology, volume 16, numéro 3, 2007, p. 126-134.
- BURATTI, E. et BARALLE, F.E., *Influence of RNA secondary structure on the pre-mRNA process*, Molecular and Cellular Biology, volume 24, numéro 24, décembre 2004, p. 10505-10514.
- BURATOWSKI, S., HAHN, S., GUARENTE, L. et SHARP, P.A., *Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II*, Cell, volume 56, numéro 4, 24 février 1989, p. 549-561.
- BURD, C.G. et DREYFUSS G., *RNA binding specificity of hnRNP A1 : significance of hnRNP A1 high-affinity binding sites in pre-mRNA splicing*, The EMBO Journal, volume 13, numéro 5, mars 1994, p. 1197-1204.
- BUSCHMANN, T., POTAPOVA, O., BAR-SHIRA, A., IVANOV, V.N., FUCHS, S.Y., HENDERSON, S., FRIED, V.A., MINAMOTO, T., ALARCON-VARGAS, D., PINCUS, M.R., GAARDE, W.A., HOLBROOK, N.J., SHILOH, Y. et RONAI, Z., *Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress*, Molecular and Cellular Biology, volume 21, numéro 8, avril 2001, p. 2743-2754.
- BUSCHMANN, T., LIN, Y., AITHMITTI, N., FUCHS, S.Y., LU, H., RESNICK-SILVERMAN, L., MANFREDI, J.J., RONAI, Z. et WU, X., *Stabilization and activation of p53 by the coactivator protein TAF<sub>II</sub>31*, The Journal of Biological Chemistry, volume 276, numéro 17, 27 avril 2001, p. 13852-13857.
- CALLINAN, P.A., WANG, J., HERKE, S.W., GARBER, R.K., LIANG, P. et BATZER, M.A., *Alu retrotransposition-mediated deletion*, Journal of Molecular Biology, volume 348, numéro 4, 13 mai 2005, p. 791-800.
- CENINI, G., SULTANA, R., MEMO, M. et BUTTERFIELD, D.A., *Elevated levels of pro-apoptotic p53 and its oxidative modification by the lipid peroxidation product, HNE, in brain from subjects with amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease*, Journal of cellular and molecular medicine, volume 12, numéro 3, 2008, p.987-994.

- CHALKLEY, G.E. et VERRIJZER, C.P., *DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs : a TAF<sub>II</sub>250-TAF<sub>II</sub>150 complex recognizes the Initiator*, The EMBO Journal, volume 18, numéro 17, 1999, p. 4835-4845.
- CHEN, L., WILLIS, S.N., WEI, A., SMITH, B.J., FLETCHER, J.I., HINDS, M.G., COLMAN, P.M., DAY, C.L., ADAMS, J.M. et HUANG, D.C., *Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function*, Molecular Cell, volume 17, 4 février 2005, p. 393-403
- CHIANG C.M., GE, H., WANG, Z., HOFFMANN, A. et ROEDER, R.G., *Unique TATA-binding protein-containing complexes and cofactors involved in transcription by RNA polymerases II and III*, The EMBO Journal, volume 12, numéro 13, 1993, p. 2749-2762.
- CHIARUGI, P. et GIANNONI, E., *Anoikis : a necessary death program for anchorage-dependent cells*, Biochemical Pharmacology, volume 76, numéro 11, 1er décembre 2008, p. 1352-1364.
- CHIPUK, J.E., BOUCHIER-HAYES, L., KUWANA, T., NEWMAYER, D.D. et GREEN, D.R., *PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53*, Science, volume 309, 9 septembre 2005, p. 1732-1735.
- CHIPUK, J.E. et GREEN, D.R., *Dissecting p53-dependent apoptosis*, Cell Death and Differentiation, volume 13, 2006, p. 994-1002.
- CHOU, M.Y., ROOKE, N., TURCK, C.W. et BLACK, D.L., *hnRNP H is a component of a splicing enhancer complex that activates a c-src alternative exon in neuronal cells*, Molecular and Cellular Biology, volume 19, numéro 1, janvier 1999, p. 69-77.
- CONNELL, C.M., WHEATLEY, S.P. et MCNEISH, I.A., *Nuclear survivin abrogates multiple cell cycle checkpoints and enhances viral oncolysis*, Cancer Research, volume 68, numéro 19, 1<sup>er</sup> octobre 2008, p. 7923-7931.
- DRESSMAN, H.K., HANS, C., BILD, A., OLSON, J.A., ROSEN, E., MARCOM, P.K., LIOTCHEVA, V.B., JONES, E.L., VUJASKOVIC, Z., MARKS, J., DEWHIRST, M.W., WEST, M., NEVINS, J.R. et BLACKWELL, K., *Gene expression profiles of multiple breast cancer phenotypes and response to neoadjuvant chemotherapy*, Clinical Cancer Research, volume 12, numéro 3, 1<sup>er</sup> février 2006, p. 819-826.
- DIKSTEIN, R., RUPPERT, S. et TJIAN, R., *TAF<sub>II</sub>250 is a bipartite protein kinase that phosphorylates the basal transcription factor RAP74*, Cell, volume 84, 8 mars 1996, p. 781-790.

DIKSTEIN, R., ZHOU, S. et TJIAN, R., *Human TAFII105 is a cell type-specific TFIID subunit related to hTAFII30*, Cell, volume 87, 4 octobre 1996, p. 137-146.

EGLOFF, S. et MURPHY, S., *Cracking the RNA polymerase II CTD code*, Trends in Genetics, volume 24, numéro 6, 2008, p. 280-288.

EPERON, L.P., GRAHAM, I.R., GRIFFITHS, A.D. et EPERON, I.C., *Effects of RNA secondary structure on alternative splicing of pre-mRNA: Is folding limited to a region behind the transcribing RNA polymerase ?*, Cell, volume 54, 29 juillet 1988, p. 393-401.

EVANS, J.R., MITCHELL, S.A., SPRIGGS, K.A., OSTROWSKI, J., BOMSZTYK, K., OSTAREK, D. et WILLIS, A.E., *Members of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the c-myc internal ribosome entry segment in vitro and in vivo*, Oncogene, volume 22, numéro 39, 11 septembre 2003, p. 8012-8020.

EXPERT-BEZANÇON, A., LECAER, J.P. et MARIE, J., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) K is a component of an intronic splicing enhancer complex that activates the splicing of the alternative exon 6A from chicken  $\beta$ -tropomyosin pre-mRNA*, The Journal of Biological Chemistry, volume 277, numéro 19, 10 mai 2002, p. 16614-16623.

FAIGER, H., IVANCHENKO, M. et HARAN, T.E., *Nearest-neighbor non-additivity versus long-range non-additivity in TATA-box structure and its implications for TBP-binding mechanism*, Nucleic Acids Research, volume 35, numéro 13, 2007, p. 4409-4419.

GANGLOFF, Y.G., ROMIER, C., THUAULT, S., WERTEN, S. et DAVIDSON, I., *The histone fold is a key structural motif of transcription factor TFIID*, Trends in biochemical sciences, volume 26, numéro 4, avril 2001, p. 250-257.

GEGONNE, A., WEISSMAN, J.D., LU, H., ZHOU, M., DASGUPTA, A., RIBBLE, R., BRADY, J.N. et SINGER, D.S., *TFIID component TAF7 functionally interacts with both TFIIH and P-TEFb*, PNAS, volume 105, numéro 14, 8 avril 2008, p. 5367-5372.

GU, W. et ROEDER, R.G., *Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain*, Cell, volume 90, 22 août 1997, p. 595-606.

GUERMAH, M., GE, K., CHIANG, C.M. et ROEDER, R.G., *The TBN protein, which is essential for early embryonic mouse development, is an inducible TAFII implicated in adipogenesis*, Molecular Cell, volume 12, octobre 2003, p. 991-1001.

HAN, J.W., FLEMINGTON, C., HOUGHTON, A.B., GU, Z., ZAMBETTI, G.P., LUTZ, R.J., ZHU, L. et CHITTENDEN, T., *Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals*, PNAS, volume 98, numéro 20, 25 septembre 2001, p. 11318-11323.

HARGOUS, Y., HAUTBERGUE, G.M., TINTARU, A.M., SKRISOVSKA, L., GOLOVANOV, A.P., STEVENIN, J., LIAN, L.Y., WILSON, S.A. et ALLAIN, F.H., *Molecular basis of RNA recognition and TAP binding by the SR proteins SRp20 and 9G8*, The EMBO Journal, volume 25, p. 5126-5137.

HAUSNER, T.P., GIGLIO, L.M. et WEINER, A.M., *Evidence for base-pairing between mammalian U2 and U6 small nuclear ribonucleoprotein particles*, Genes & Development, volume 4, 1990, p. 2146-2156.

HIRATA, H., TAKAHASHI, A., KOBAYASHI, S., YONEHARA, S., SAWAI, H., OKAZAKI, T., YAMAMOTO, K. et SASADA, M., *Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis*, Journal of Experimental Medicine, volume 187, numéro 4, 16 février 1998, p. 587-600.

HISATAKE, K., OHTA, T., TAKADA, R., GUERMAH, H., HORIKOSHI, M., NAKATANI, Y. et ROEDER, R.G., *Evolutionary conservation of human TATA-binding-polypeptide-associated factors TAF<sub>II</sub>31 and TAF<sub>II</sub>80 and interactions of TAF<sub>II</sub>80 with other TAFs and with general transcription factors*, PNAS, volume 92, août 1995, p. 8195-8199.

HOLSTEGE, F.C.P., VAN DER VLIET, P.C. et TIMMERS, H.T., *Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH*, The EMBO Journal, volume 15, numéro 7, 1996, p. 1666-1677.

HUTTON, M., LENDON, C.L., RIZZU, P., BAKER, M., FROELICH, S., HOULDEN, H., PICKERING-BROWN, S., CHAKRAVERTY, S., ISAACS, A., GROVER, A., HACKETT, J., ADAMSON, J., LINCOLN, S., DICKSON, D., DAVIES, P., PETERSEN, R.C., STEVENS, M., DE GRAAFF, E., WAUTERS, E., VAN BAREN, J., HILLEBRAND, M., JOOSSE, M., KWON, J.M., NOWOTNY, P., CHE, L.K., NORTON, J., MORRIS, J.C., REED, L.A., TROJANOWSKI, J., BASUN, H., LANNFELT, L., NEYSTAT, M., FAHN, S., DARK, F., TANNENBERG, T., DODD, P.R., HAYWARD, N., KWOK, J.B., SCHOFIELD, P.R., ANDREADIS, A., SNOWDEN, J., CRAUFURD, D., NEARY, D., OWEN, F., OOSTRA, B.A., HARDY, J., GOATE, A., VAN SWIETEN, J., MANN, D., LYNCH, T. et HEUTINK, P., *Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17*, Nature, volume 393, 18 juin 1998, p.702-705.

HSU, S.Y. et HSUEH, A.J., *A splicing variant of the Bcl-2 member Bok with a truncated BH3 domain induces apoptosis but does not dimerize with antiapoptotic Bcl-2 proteins in vitro*, The Journal of Biological Chemistry, volume 273, numéro 46, 13 novembre 1998, p. 30139-30146.

IMBALZANO A.N., ZARET, K.S. et KINGSTON, R.E., *Transcription factor (TF) IIB and TFIIA can independently increase the affinity of the TATA-binding protein for DNA*, The Journal of Biological Chemistry, volume 269, numéro 11, 18 mars 1994, p. 8280-8286.

IMHOF, A., YANG X.J., OGRYZKO, V.V., NAKATANI, Y., WOLFFE, A.P. et GE, H., *Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases*, Current Biology, volume 7, 1997, p. 689-692.

JUVEN-GERSHON, T., HSU, J.Y., THEISEN, J.W. et KADONAGA, J.T., *The RNA polymerase II core promoter – the gateway to transcription*, Current Opinion in Cell Biology, volume 20, 2008, p. 253-259.

KANOPKA, A., MÜHLEMANN, O. et AKUSJÄRVI, G., *Inhibition by SR proteins of splicing of a regulated adenovirus pre-mRNA*, Nature, volume 381, 6 juin 1996, p. 535-538.

KASTAN, M.B., ONYEKWERE, O., SIDRANSKY, D., VOGELSTEIN, B. et CRAIG, R.W., *Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage*, Cancer Research, volume 51, 1<sup>er</sup> décembre 1991, p. 6304-6311.

KAYAGAKI, N., YAMAGUCHI, N., NAKAYAMA, M., KAWASAKI, A., AKIBA, H., OKUMURA, K. et YAGITA, H., *Involvement of TNF-related apoptosis-inducing ligand in human CD4<sup>+</sup> T cell-mediated cytotoxicity*, The Journal of Immunology, volume 162, 1999, p. 2639-2647.

KENT, O.A., REAYI, A., FOONG, L., CHILIBECK, K.A. et MACMILLAN, A.M., *Structuring of the 3' splice site by U2AF65*, The Journal of Biological Chemistry, volume 278, numéro 50, 12 décembre 2003, p. 50572-50577.

KENT, O.A., RITCHIE, D.B. et MACMILLAN, A.M., *Characterization of a U2AF-independent commitment complex (E') in the mammalian spliceosome assembly pathway*, Molecular and Cellular Biology, volume 25, numéro 1, janvier 2005, p. 233-240.

KILLEEN, M.T. et GREENBLATT, J.F., *The general transcription factor RAP30 binds to RNA polymerase II and prevents it from binding non-specifically to DNA*, Molecular and Cellular Biology, volume 12, numéro 1, janvier 1992, p. 30-37.

KISCHKEL, F.C., HELLBARDT, S., BEHRMANN, I., GERMER, M., PAWLITA, M., KRAMMER, P.H. et PETER, M.E., *Cytotoxicity-dependent Apo-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor*, The EMBO Journal, volume 14, numéro 22, 1995, p. 5579-5588.



KISCHKEL, F.C., LAWRENCE, D.A., TINEL, A., LEBLANC, H., VIRMANI, A., SCHOW, P., GAZDAR, A., BLENIS, J., ARNOTT, D. et ASHKENAZI, A., *Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and initiation of apoptosis in the absence of caspase-8*, The Journal of Biological Chemistry, volume 276, numéro 49, 7 décembre 2001, p. 46639-46646.

KLIMEK-TOMCZAK, K., WYRWICZ, L.S., JAIN, S., BOMSZTYK, K. et OSTROWSKI, J., *Characterization of hnRNP K protein-RNA interaction*, Journal of Molecular Biology, volume 342, numéro 4, 24 septembre 2004, p. 1131-1141.

KOHTZ, J.D., JAMISON, S.F., WILL, C.L., ZUO, P., LÜRHMANN, R., GARCIA-BLANCO, M.A. et MANLEY, J.L., *Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors*, Nature, volume 368, 10 mars 1994, p.119-124.

KURIBAYASHI, K. et EL-DEIRY, W.S., *Regulation of programmed cell death by the p53 pathway*, Advances in experimental medicine and biology, volume 615, 2008, p. 201-221.

LAFERTÉ A., FAVRY, E., SENTENAC, A., RIVA, M., CARLES, C. et CHÉDIN, S., *The transcriptional activity of RNA polymerase I is a key determinant for the level of all ribosome components*, Genes & Development, volume 20, numéro 15, 2006, p. 2030-2040.

LEE, Y., KIM, M., HAN, J., YEOM, K.H., LEE, S., BAEK, S.H. et KIM, V.N., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*, The EMBO Journal, volume 23, 2004, p. 4051-4060.

LEI, H. et VOŘECHOVSKÝ, I., *Identification of splicing silencers and enhancers in sense Alus : a role for pseudoacceptors in splice site repression*, Molecular and Cellular Biology, volume 25, numéro 16, août 2005, p. 6912-6920.

LETAI, A., BASSIK, M.C., WALENSKY, L.D., SORCINELLI, M.D., WEILER, S. et KORSMEYER, S.J., *Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics*, Cancer Cell, volume 2, septembre 2002, p.183-192.

LEV-MAOR, G., SOREK, R., SHOMRON, N. et AST, G., *The birth of an alternatively spliced exon: 3' splice-site selection in Alu exons*, Science, volume 300, 23 mai 2003, p. 1288-1291.

LI, H., ZHU, H., XU, C.J. et YUAN, J., *Cleavage of BID by Caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*, Cell, volume 94, 21 août 1998, p. 491-501.

- LI, W.H., GU, Z., WANG, H. et NEKRUTENKO, A., *Evolutionary analyses of the human genome*, Nature, volume 409, 15 février 2001, p. 847-849.
- LIM, L.P. et BURGE, C.B., *A computational analysis of sequence features involved in recognition of short introns*, PNAS, volume 98, numéro 20, 25 septembre 2001, p. 11193-11198.
- LIM, M.K., TANG, V., LE SAUX, A., SCHÜLLER, A., BONGARDS, C. et LEHMING, N., *Gall1p dosage-compensates transcriptional activator deletions via Taf14p*, Journal of molecular biology, volume 374, 2007, p.9-23.
- LIU, W.L., COLEMAN, R.A., GROB, P., KING, D.S., FLORENS, L., WASHBURN, M.P., GELES, K.G., YANG, J.L., RAMEY, V., NOGALES, E. et TJIAN, R., *Structural changes in TAF4b-TFIID correlate with promoter selectivity*, Molecular Cell, volume 29, 18 janvier 2008, p. 81-91.
- LUNA, R., GAILLARD, H., GONZÁLES-AGUILERA, C. et AGUILERA, A., *Biogenesis of mRNPs: integrating different processes in the eukaryotic nucleus*, Chromosoma, volume 117, numéro 4, août 2008, p. 319-331.
- MAKAŁOWSKI, W., MITCHELL, G.A. et LABUDA, D., *Alu sequences in the coding regions of mRNA: a source of protein variability*, Trends in Genetics, volume 10, numéro 6, juin 1994, p. 188-193.
- MARTINEZ-CONTRERAS, R., FISETTE, J.-F., HASSAN NASIM, F.-U., MADDEN, R., CORDEAU, M. et CHABOT, B., *Intronic binding sites for hnRNP A/B and hnRNP F/H proteins stimulate pre-mRNA splicing*, volume 4, numéro 2, février 2006, p. 0172-0184.
- MASCHHOFF, K.L. et PADGETT, R.A., *Phosphorothioate substitution identifies phosphate groups important for pre-mRNA splicing*, Nucleic Acids Research, volume 20, numéro 8, 25 avril 1992, p. 1949-1957.
- MATLIN, A.J. et MOORE, M.J., *Spliceosome assembly and composition*, Advances in experimental medicine and biology, volume 623, 2007, p. 14-35.
- MATSUI, T., SEGALL, J., WEIL, P.A. et ROEDER, R.G., *Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II*, The Journal of Biological Chemistry, volume 255, numéro 24, 25 décembre 1980, p. 11992-11996.
- MENGUS, G., MAY, M., JACQ, X., STAUB, A., TORA, L., CHAMBON, P. et DAVIDSON, I., *Cloning and characterization of hTAFII18, hTAFII20 and hTAFII28: three subunits of the human transcription factors TFIID*, The EMBO Journal, volume 14, numéro 7, 1995, p. 1520-1531.

MIRONOV, A.A., FICKETT, J.W. et GELFAND, M.S., *Frequent alternative splicing of human genes*, Genome Research, volume 9, numéro 12, décembre 1999, p. 1288-1293.

MÜLLER, F., DEMÉNY, M.A. et TORA, L., *New problems in RNA polymerase II transcription initiation: matching the diversity of core promoters with a variety of promoter recognition factors*, The Journal of Biological Chemistry, volume 282, numéro 20, 18 mai 2007, p. 14685-14689.

MUZIO, M., STOCKWELL, B.R., STENNICKE, H.R., SALVESEN, G.S. et DIXIT, V.M., *An induced proximity model for caspase-8 activation*, The Journal of Biological Chemistry, volume 273, numéro 5, 30 janvier 1998, p. 2926-2930.

NAKANO, K. et VOUSDEN, K.H., *PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53*, Molecular Cell, volume 7, mars 2001, p. 683-694.

ODA, E., OHKI, R., MURASAWA, H., NEMOTO, J., SHIBUE, T., YAMASHITA, T., TOKINO, T., TANIGUCHI, T. et TANAKA, N., *Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis*, Science, volume 288, 12 mai 2000, p. 1053-1057.

OSTROWSKI, J., SCHULLERY, D.S., DENISENKO, O.N., HIGAKI, Y., WATTS, J., AEBERSOLD, R., STEMPKA, L., GSCHWENDT, M. et BOMSZTYK, K., *Role of tyrosine phosphorylation in the regulation of the interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein with its protein and RNA partners*, The Journal of Biological Chemistry, volume 275, numéro 5, 4 février 2000, p. 3619-3628.

POLUNOVSKY, V.A., WENDT, C.H., INGBAR, D.H., PETERSON, M.S. et BITTERMAN, P.B., *Induction of endothelial cell apoptosis by TNF $\alpha$  : modulations by inhibitors of protein synthesis*, Experimental cell research, volume 214, 1994, p. 584-594.

POZZOLI, U. et SIRONI, M., *Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals*, Cellular and Molecular Life Sciences, volume 62, numéro 14, juillet 2005, p. 1579-1604.

REINBERG, D., HORIKOSHI, M. et ROERDER, R.G., *Factors involved in specific transcription in mammalian RNA polymerase II. Functional analysis of initiation factors IIA and IID and identification of a new factor operating at sequences downstream of the initiation site*, The Journal of Biological Chemistry, volume 262, numéro 7, 5 mars 1987, p. 3322-3330.

RIEDL, S.J., FUENTES-PRIOR, P., RENATUS, M., KAIRIES, N., KRAPP, S., HUBER, R., SALVESEN, G.S. et BODE, W., *Structural basis for the activation of human procaspase-7*, PNAS, volume 98, numéro 26, 18 décembre 2001, p. 14790-14795.

ROBERTS, D.N., STEWART, A.J., HUFF, J.T. et CAIRNS, B.R., *The RNA polymerase III transcriptome revealed by genome-wide localization and activity-occupancy relationships*, PNAS, volume 100, numéro 25, 9 décembre 2003, p. 14695-14700.

ROBINSON, M.M., YATHERAJAM, G., RANALLO, R.T., BRIC, A., PAULE, M.R. et STARGELL, L.A., *Mapping and functional characterization of the TAF<sub>II</sub>11 interaction with TFIIA*, Molecular and Cellular Biology, volume 25, numéro 3, février 2005, p. 945-957.

ROJO-NIERSBACH, E., FURUKAWA, T. et TANESE, N., *Genetic dissection of hTAF<sub>II</sub>130 defines a hydrophobic surface required for interaction with glutamine-rich activators*, The Journal of Biological Chemistry, volume 274, 1999, p. 33778-33784.

SADHALE, P., VERMA, J. et NAOREM, A., *Basal transcription machinery: role in regulation of stress response in eukaryotes*, Journal of Biosciences, volume 32, numéro 3, avril 2007, p.569-578.

SCHON, O., FRIEDLER, A., BYCROFT, M., FREUND, S.M. et FERSHT, A.R., *Molecular mechanism of the interaction between MDM2 and p53*, Journal of Molecular Biology, volume 323, 2002, p. 491-501.

SELLECK, W., HOWLEY, R., FANG, Q., PODOLNY, V., FRIED, M.G., BURATOWSKI, S. et TAN, S., *A histone fold TAF octamer within the yeast TFIID transcriptional coactivator*, Nature Structural Biology, volume 8, numéro 8, août 2001, p. 695-700.

SHAO, H., REVACH, M., MOSHONOV, S., TZUMAN, Y., GAZIT, K., ALBECK, S., UNGER, T. et DIKSTEIN, R., *Core promoter binding by histone-like TAF complexes*, Molecular and Cellular Biology, volume 25, numéro 1, janvier 2005, p.206-219.

SHEN, W.-C., BHAUMICK, S.R., CAUSTON, H.C., SIMON, I., ZHU, X., JENNINGS, E.G., WANG, T.H., YOUNG, R.A. et GREEN, M.R., *Systematic analysis of essential yeast TAFs in genome-wide transcription and preinitiation complex assembly*, The EMBO Journal, volume 22, numéro 13, 2003, p. 3395-3402.

SHERIDAN, J.P., MARSTERS, S.A., PITTI, R.M., GURNEY, A., SKUBATCH, M., BALDWIN, D., RAMAKRISHNAN, L., GRAY, C.L., BAKER, K., WOOD, W.I., GODDARD, A.D., GODOWSKI, D. et ASHKENAZI, A., *Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors*, Science, volume 277, numéro 5327, 8 août 1997, p.818-821.

SHIBUE, T., TAKEDA, K., ODA, E., TANAKA, H., MURASAWA, H., TAKAOKA, A., MORISHITA, Y., AKIRA, S., TANIGUCHI, T. et TANAKA, N., *Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response*, Genes & Development, volume 17, 2003, p. 2233-2238.

SHIN, C. et MANLEY, J.L., *Cell signalling and the control of pre-mRNA splicing*, Nature Reviews Molecular cell Biology, volume 5, numéro 9, septembre 2004, p. 727-738.

SICKMIER, E.A., FRATO, K.E., SHEN, H., PARANAWITHANA, S.R., GREEN, M.R. et KIELKOPF, C.L., *Structural basis for polypyrimidine tract recognition by the essential pre-mRNA splicing factor U2AF65*, Molecular Cell, volume 23, numéro 1, 7 juillet 2006, p. 49-59.

SIMARD, M.J. et CHABOT, B., *SRp30c is a repressor of 3' splice site utilization*, Molecular and Cellular Biology, volume 22, numéro 12, juin 2002, p. 4001-4010.

SINGER, G.A., WU, J., YAN, P., PLASS, C., HUANG, T.H. et DAVULURI, R.V., *Genome-wide analysis of alternative promoters of human genes using a custom promoter tiling array*, BMC Genomics, volume 9, 2008, p. 349-364.

SINGH, S. et DIKSHIT, M., *Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: involvement of nitric oxide*, Brain Research Reviews, volume 54, numéro 2, juin 2007, p. 233-250.

SOREK, R., AST, G. et GRAUR, D., *Alu-containing exons are alternatively spliced*, Genome Research, volume 12, numéro 7, juillet 2002, p. 1060-1067.

SOREK, R., LEV-MAOR, G., REZNIK, M., DAGAN, T., BELINKY, F., GRAUR, D. et AST, G., *Minimal conditions for exonization of intronic sequences: 5' splice site formation in Alu exons*, Molecular Cell, volume 14, 23 avril 2004, p. 221-231.

SOUTOGLOU, E., DEMÉNY, M.A., SCHEER, E., FIENGA, G., SASSONE-CORSI, P. et TORA, L., *The nuclear import of TAF10 is regulated by one of its three histone fold domain-containing interaction partner*, Molecular and Cellular Biology, volume 25, numéro 10, mai 2005, p. 4092-4104.

STAKNIS, D. et REED, R., *SR proteins promote the first specific recognition of pre-mRNA and are present together with the U1 Small Nuclear Ribonucleoprotein Particle in general splicing enhancer complex*, Molecular and Cellular Biology, volume 14, numéro 11, novembre 1994, p. 7670-7682.

STALEY, J.P. et GUTHRIE, C., *An RNA switch at the 5' splice site requires ATP and the DEAD Box protein Prp28p*, Molecular Cell, volume 3, numéro 1, janvier 1999, p. 55-64.

STENNICKE, H.R., JÜRGENSMEIER, J.M., SHIN, H., DEVERAUX, Q., WOLF, B.B., YANG, X., ZHOU, Q., ELLERBY, H.M., ELLERBY, L.M., BREDESEN, D., GREEN, D.R., REED, J.C., FROELICH, C.J. et SALVESEN, G.S., *Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8*, The Journal of Biological Chemistry, volume 273, numéro 42, 16 octobre 1998, p. 27084-27090.

SUBRAMANIAN, T., VIJAYALINGAM, S., LOMONOSOVA, E., ZHAO, L.J. et CHINNADURAI, G., *Evidence for involvement of BH3-only proapoptotic members in adenovirus-induced apoptosis*, Journal of Virology, volume 81, numéro 19, octobre 2007, p. 10486-10495.

SUDA, T et NAGATA, S., *Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis*, The journal of experimental medicine, volume 179, numéro 3, 1<sup>er</sup> mars 1994, p. 873-879.

SUN, Y. et LEAMAN, D.W., *Involvement of Noxa in cellular apoptotic responses to interferon, double-stranded RNA, and virus infection*, The Journal of Biological Chemistry, volume 280, numéro 16, 22 avril 2005, p. 15561-15568.

SWANSON, M.S. et DREYFUSS, G., *Classification and purification of proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles by RNA-binding specificities*, Molecular and Cellular Biology, volume 8, numéro 5, mai 1988, p. 2237-2241.

TATARAKIS, A., MARGARITIS, T., MARTINEZ-JIMENEZ, C.P., KOUSKOUTI, A., MOHAN 2<sup>ND</sup>, W.S., HARONITI, A., KAFETZOPOULOS, D., TORA, L. et TALIANIDIS, I., *Dominant and redundant functions of TFIID involved in the regulation of hepatic genes*, Molecular Cell, volume 31, 22 août 2008, p. 531-543.

THISTED, T., LIAKHOV, D.L. et LIEBHABER, S.A., *Optimized RNA targets of two closely related triple KH domain proteins, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and  $\alpha$ -CP-2KL, suggest distinct modes of RNA recognition*, The Journal of Biological Chemistry, volume 276, numéro 20, 18 mai 2001, p. 17484-17496.

THUT, C.J., CHEN, J.L., KLEMM, R. et TJIAN, R., *p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60*, Science, volume 267, numéro 5194, 6 janvier 1995, p. 100-104.

VENABLES, J.P., KOH, C.S., FROELICH, U., LAPOINTE, E., COUTURE, S., INKEL, L., BRAMARD, A., PAQUET, E.R., WATIER, V., DURAND, M., LUCIER, J.F., GERVAIS-BIRD, J., TREMBLAY, K., PRINOS, P., KLINCK, R., ELELA, S.A. et CHABOT, B., *Multiple and specific mRNA processing targets for the major human hnRNP proteins*, Molecular and Cellular Biology, volume 28, numéro 19, octobre 2008, p. 6033-6043.

VILLUNGER, A., MICHALAK, E.M., COULTAS, L., MÜLLAUER, F., BÖCK, G., AUSSERLECHNER, M.J., ADAMS, J.M. et STRASSER, A., *p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins Puma and Noxa*, Science, volume 302, 7 novembre 2003, p. 1036-1038.

VOULGARI, A., VOSKOU, S., TORA, L., DAVIDSON, I., SASAZUKI, T., SHIRASAWA, S. et PINTZAS, A., *TATA box-binding protein-associated factor 12 is important for RAS-induced transformation properties of colorectal cancer cells*, Molecular Cancer Research, volume 6, numéro 6, juin 2008, p. 1071-1083.

WAHL, M.C., WILL, C.L. et LÜHRMANN, R., *The spliceosome : Design principles of a dynamic RNP machine*, Cell, volume 136, 20 février 2009, p. 701-718.

WANG, E.T., SANDBERG, R., LUO, S., KHREBTUKOVA, I., ZHANG, L., MAYR, C., KINGSMORE, S.F. SCHROTH, G.P. et BURGE, C.B., *Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes*, Nature, volume 456, 27 novembre 2008, p. 470-476.

WANG, W., NAHTA, R., HUPER, G. et MARKS, J.R., *TAFII70 isoform-specific growth suppression correlates with its ability to complex with the GADD45a protein*, Molecular Cancer Research, volume 2, numéro 8, août 2004, p. 442-452.

WANG, Z. et BURGE, C.B., *Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code*, RNA, volume 14, 2008, p. 802-813.

WEINZIERL, R.O., RUPPERT, S., DYNLACHT, B.D., TANESE, N. et TJIAN, R., *Cloning and expression of Drosophila TAFII60 and human TAFII70 reveal conserved interactions with other subunits of TFIID*, The EMBO Journal, volume 12, numéro 13, 1993, p. 5303-5309.

WILHELM, E., PELLAY, F.X., BENECKE, A. et BELL, B., *TAF6 $\delta$  controls apoptosis and gene expression in the absence of p53*, PLoS ONE, volume 3, numéro 7, juillet 2008, p. e2721.

WOLFF, S., ERSTER, S., PALACIOS, G. et MOLL, U.M., *p53's mitochondrial translocation and MOMP action is independent of Puma and Bax and severely disrupts mitochondrial membrane integrity*, Cell Research, volume 18, 2008, p. 733-744.

WRIGHT, K.J., MARR 2<sup>ND</sup>, M.T. et TJIAN, R., *TAF4 nucleates a core subcomplex of TFIID and mediates activated transcription from a TATA-less promoter*, PNAS, volume 103, numéro 33, 15 août 2006, p. 12347-12352.

WU, S., ROMFO, C.M., NILSEN, T.W. et GREEN, M.R., *Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF<sup>35</sup>*, Nature, volume 402, 16 décembre 1999, p. 832-835.

XIE, X., KOKUBO, T., COHEN, S.L., MIRZA, U.A., HOFFMANN, A., CHAIT, B.T., ROEDER, R.G., NAKATANI, Y. et BURLEY, S.K., *Structural similarity between TAFs and the heterotetrameric core of the histone octamer*, Nature, volume 380, 28 mars 1996, p.316-322.



YIN, X.M., OLTVAI, Z.N. et KORSMEYER, S.J., *BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax*, Nature, volume 369, 26 mai 1994, p. 321-323.

ZAMORE, P.D., PATTON, J.G. et GREEN, M.R., *Cloning and domain structure of the mammalian splicing factor U2AF*, Nature, volume 355, 13 février 1992, p. 609-614.

ZHANG, H., SOMASUNDARAM, K., PENG, Y., TIAN, H., ZHANG, H., BI, D., WEBER, B.L. et EL-DEIRY, W.S., *BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity*, Oncogene, volume 16, numéro 13, 2 avril 1998, p. 1713-1721.

ZHOU, Z., LICKLIDER, L.J., GYGI, S.P. et REED, R., *Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome*, Nature, volume 419, 12 septembre 2002, p. 182-185.

ZOU, H., LI, Y., LIU, X. et WANG, X., *An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9*, The Journal of Biological Chemistry, volume 274, numéro 17, 23 avril 1999, p. 11549-11556.

ZUO, P. et MANIATIS, T., *The splicing factor U2AF35 mediates critical protein-protein interactions in constitutive and enhancer-dependent splicing*, Genes & Development, volume 10, numéro 11, 1<sup>er</sup> juin 1996, p. 1356-1368.

# ANNEXES

## Annexe 1.

				site 5' d'épissage distal			
				↓			
human	1	AACG-----	-----G	ATGAGGTCAG	CTACCGCATC	AAAGAGATCG	
taf6_bos_tau	1	GACG-----	-----G	ATGAGGTCAG	CTACCGCATC	AAGGAGATCG	
taf6_canis.f	1	GACC-----	-----G	ATGAGGTCAG	CTACCGCATC	AAGGAGATTG	
taf6_Monodel	1	gacctgccag	ttattaACAG	ATGAAGTAG	TTATCGTATC	AAGGAGATTG	
taf6_mus_mus	1	G-----	-----ACAG	ATGAGGTCAG	CTACCGCATC	AAGGAGATTG	
taf6_pan_tro	1	AACG-----	-----G	ATGAGGTCAG	CTACCGCATC	AAAGAGATCG	
taf6_rattus.	1	G-----	-----ACAG	ATGAGGTCAG	CTACCGCATC	AAGGAGATTG	
taf6_rhesus.	1	GACG-----	-----G	ATGAGGTCAG	CTACCGCATC	AAAGAGATTG	
		site 5' d'épissage proximal		mutant NheI			
		↓					
human	36	CACAGGTGAC	CCGGCCCTTC	TGTCCAGCTC	TACATTGGGT	-----	
taf6_bos_tau	36	CGCAGGTACC	CTGGTCTTCC	TGCACTGCAC	AG-----	-----	
taf6_canis.f	36	CCCAGGTAGC	CTGACCTGCC	TCCCCAGCCC	TGCATCATAT	-----	
taf6_Monodel	51	CACAGGTGA-	----GCCITg	g-----	-----	-----	
taf6_mus_mus	36	CCCAGGTAA-	----CCCTTT	TGTCCAGCTT	CCCTTTGTGC	TAACACTCCA	
taf6_pan_tro	36	CACAGGTGAC	CCGGCCCTTC	TGTCCAGCTC	TACGTTGGGT	-----	
taf6_rattus.	36	CCCAGGTAA-	----GCCITC	TGCCAGCTT	TGCTTTGTGC	TAACAATTCA	
taf6_rhesus.	36	CACAGGTGAC	CCAGCCCTTC	TGTCCAGCTC	CACGTTGGGT	-----	
human	76	-----	-----	-----	-----	-----	
taf6_bos_tau	68	-----	-----	-----	-----	-----	
taf6_canis.f	76	-----	-----	-----	-----	-----	
taf6_Monodel	67	-----	-----	-----	-----	-----	
taf6_mus_mus	81	ACCTCCTATG	TAACTeCaGA	TATCCTTGAA	CTTCTGACCC	TCCTGCCTCC	
taf6_pan_tro	76	-----	-----	-----	-----	-----	
taf6_rattus.	81	ACCTACTATG	TAACTaagGA	TAACCTTGAA	CTTCTGACCC	TCTTGTGCCC	
taf6_rhesus.	76	-----	-----	-----	-----	-----	
				mutant C-T			
human	76	-----	-----	-----	-CCA---TGT	-C-----	
taf6_bos_tau	68	-----	-----	-----	---AGACTGC	-T-----	
taf6_canis.f	76	-----	-----	-----	-CCA---TAT	gcT-----	
taf6_Monodel	67	-----	-----	-----	-----	-----	
taf6_mus_mus	131	ACCTcCCTACT	GCTGGGATTG	AGGTTCTAAT	ACCA---TGT	-CTTGTtTA	
taf6_pan_tro	76	-----	-----	-----	-CCAc---GT	-C-----	
taf6_rattus.	131	ACCT-CCACT	GCTGGGATTG	AGGGTCTAAC	ACCA---TGT	-CTTGTc-A	
taf6_rhesus.	76	-----	-----	-----	-CCAGGAIGT	-C-----	
human	83	-----	-----AC	CCAGGGCCCC-	-----	-----	
taf6_bos_tau	76	-----	-----GC	CCAGGCCGC-	-----	-----	
taf6_canis.f	85	-----	-----GC	CGGGGGCCt-	-----	-----	
taf6_Monodel	67	-----	-----	-----	-----	-----	
taf6_mus_mus	176	TGGGATGCTG	AGGATTGAAC	TCGGGTCCTT	GTGCGTGCTg	g-----GCT	
taf6_pan_tro	83	-----	-----AC	CCAGGGCCCC-	-----	-----	
taf6_rattus.	174	TGTGATGCTT	GGGATTGAAC	TCAGGCTCCT	GTGCCTGCTa	ggcacatGCT	
taf6_rhesus.	86	-----	-----GC	CCGGGGCCCC-	-----	-----	

human	94	-----	-----CGTC	CT---TAGGA	TTTTGGGCTG	A-----
taf6_bos_tau	87	-----	-----CTTC	TTcccCAGGG	TCICTGGCTG	A-----
taf6_canis.f	96	-----	--CCTTCTTC	CT---CAAGC	TGTCAGACTC	A-----
taf6_Monodel	67	-----	-----TTT	CT---CAGaa	gccgctgggt	ttttttttcc
taf6_mus_mus	220	TTACTCACTG	ACCCGTATTT	CT---CAGGG	TCAGAGATga	gtatc-----
taf6_pan_tro	94	-----	-----CGTC	CT---TAGGA	TTTTGGGCTG	A-----
taf6_rattus.	224	TTACTCAGTG	AGCCATATTC	CT---CAGGG	TCTTAGATAC	A-----
taf6_rhesus.	97	-----	-----CGTC	CT---TAGGA	TTTTGGGCTG	A-----

human	116	-----	-----	-----	-----	-----
taf6_bos_tau	112	-----	-----	-----	-----	-----
taf6_canis.f	122	-----	-----	-----	-----	-----
taf6_Monodel	97	ccccctaacc	cactgaactc	tcaaaTCITC	TTgattcat-	-----
taf6_mus_mus	262	-----	-----	-----ICTTC	TTagtggggc	attggtgggg
taf6_pan_tro	116	-----	-----	-----	-----	-----
taf6_rattus.	262	-----	-----	-----	-----	-----
taf6_rhesus.	119	-----	-----	-----	-----	-----

human	116	-----	-----	-----	-----	-----
taf6_bos_tau	112	-----	-----	-----	-----	-----
taf6_canis.f	122	-----	-----	-----	-----	-----
taf6_Monodel	136	-----	-----	-----	-----	-----
taf6_mus_mus	287	tatgccttta	atcccagcac	ttggagtcag	aggcaggggg	aatctcttga
taf6_pan_tro	116	-----	-----	-----	-----	-----
taf6_rattus.	262	-----	-----	-----	-----	-----
taf6_rhesus.	119	-----	-----	-----	-----	-----

human	116	-----	-----	-----	-----	-----
taf6_bos_tau	112	-----	-----	-----	-----	-----
taf6_canis.f	122	-----	-----	-----	-----	-----
taf6_Monodel	136	-----	-----	-----	-----	-----
taf6_mus_mus	337	acttgaggcc	agcttggtat	atacagagag	ttccaggaga	gccagagcta
taf6_pan_tro	116	-----	-----	-----	-----	-----
taf6_rattus.	262	-----	-----	-----	-----	-----
taf6_rhesus.	119	-----	-----	-----	-----	-----

human	116	-----	-----	-----	-----	-----
taf6_bos_tau	112	-----	-----	-----	-----	-----
taf6_canis.f	122	-----	-----	-----	-----	-----
taf6_Monodel	136	--CAGAAAGA	ACCCTccaat	tctccactcc	caaatatTGT	GTGAATAAAI
taf6_mus_mus	387	caCAGAGAAA	ACCCTg----	-----	-----TCT	CTGAAAACAA
taf6_pan_tro	116	-----	-----	-----	-----	-----
taf6_rattus.	262	-----	-----	-----	-----	-----
taf6_rhesus.	119	-----	-----	-----	-----	-----

```

human          116  -----T GTCTGTTCTG -----
taf6_bos_tau   112  -----C GTCTGTCCTC -----
taf6_canis.f   122  -----G GTC-CTTCTG -----
taf6_Monodel   184  TAGCTGCATC TTCTCTTCTG -----
taf6_mus_mus   416  AAACAAAATC Tct--TTCCC -----
taf6_pan_tro   116  -----T GTCTGTTCTG -----
taf6_rattus.   262  -----T ATCTCTTCTC agagggggccc tggcgggggca ggccttcaat
taf6_rhesus.   119  -----T GTCTATTCTG -----

human          127  -----
taf6_bos_tau   123  -----
taf6_canis.f   132  -----
taf6_Monodel   204  -----
taf6_mus_mus   434  -----
taf6_pan_tro   127  -----
taf6_rattus.   303  cccagcactt ggagtttgag gccagcctgg tttacatagt gagttccagg
taf6_rhesus.   130  -----

human          127  -----
taf6_bos_tau   123  -----
taf6_canis.f   132  -----
taf6_Monodel   204  -----
taf6_mus_mus   434  -----
taf6_pan_tro   127  -----
taf6_rattus.   353  aaagccaggg ctacacagag gaagaccctg tctcggaaaa caaaagcaaa
taf6_rhesus.   130  -----

human          127  ----- -TCACCG-AC -C----- ----CCAGGA TGCCTTGA--
taf6_bos_tau   123  ----- -CCACCCCCC aC----- ----CCAGGA TGCCTTGA--
taf6_canis.f   132  ----- -TCTCCACCC -C----- ----CCAGGA TGCCTTGA--
taf6_Monodel   204  ----- -TGA CTctgg ttttcaactt ctctCTAGGA TGCCCTaaaa
taf6_mus_mus   434  ----- -CCCCAC-CC -C----- ----CTAGGA TGCCCTGA--
taf6_pan_tro   127  ----- -TCACCG-AC -C----- ----CCAGGA TGCCTTGA--
taf6_rattus.   403  atctcttttcc tTCTCAC-CC -C----- ----CTAGGA TGCTTTGA--
taf6_rhesus.   130  ----- -TCACCC-AC -C----- ----CCAGGA TGCCTTGA--

human          150  -----
taf6_bos_tau   148  -----
taf6_canis.f   156  -----
taf6_Monodel   243  tttatgcaca tgg
taf6_mus_mus   457  -----
taf6_pan_tro   150  -----
taf6_rattus.   437  -----
taf6_rhesus.   153  -----

```

**Figure 27. Alignement de séquence pour TAF6.** Alignement de séquence entre 8 espèces : humain (*human*), bovin (*bos taurus*), chien (*canis*), opossum (*monodelphis domestica*), souris (*mus musculus*), chimpanzé (*pan troglodytes*), rat (*rattus*) et le macaque Rhésus (*rhesus*). L'alignement de séquence a été effectué par le logiciel DIALIGN (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign/>).



## Annexe 2.

```

1   atgggcatcgcccagattcaggaggagacctgccagctgctaacggatga  50
    site 5' d'épissage      site 5' d'épissage
    distal                  proximal
    SRp20 SF2/ASF
51   ggtcagctaccgdatcaaagagatcgcacaggtgacccggcccttctgtc  100

101  cagctctacattgggtccatgtcaccagggccccgtccttaggattttg  150
                                hnRNP A1
                                site 3' d'épissage
151  ggctgatgtctgttctgtcaccgaccccaggatgccttgaagttcatgca  200

201  catggggaagcggcagaagctcaccaccagtgcattgactacgcctt  249

```

**Figure 28.** Site de liaison activateur déterminé par ESEFinder et associé à 3 protéines de liaison à l'ARN. Le site ESEFinder (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>) a permis d'identifier des séquences activatrices potentielles liant des protéines de liaison à l'ARN (pour SF2/ASF). De plus, une recherche visuelle de séquences de liaison à l'ARN (SRp20 et hnRNP A1) a été effectuée sur la séquence du minigène. Ici, SRp20, SF2/ASF et hnRNP A1 sont les candidats possibles pour la liaison de ces sites potentiels dus à leur séquence de liaison consensus.

## Annexe 3.

**Tableau 6.** 6 premières séries d'ADNc de siRNAs contre différentes protéines dans 7 lignées cellulaires testées pour le changement d'épissage de TAF6

Nom du siRNA	HeLa ws	BJ	PC3	MCF7	MDA-MB- 231	Skov3	Ovarc3
ADAR2-2						+ α	
ARID4B-5					-		-
CLK1-2				-	-	-	-
DEK-1			-	-	-		
DEK-2			-	-	-		
DDX39-1						+ α	-
DDX39-2						+ α	-
FMR1-1							++ δ
FMR1-2							+++ δ
hnRNP A1-5	++ α	-	-	-	+ α	-	
hnRNP A1-6	-	-	-	-	+ α	-	-
hnRNP A2-1	-	-	-	-	-	+ δ	-
hnRNP A2-3	++ α		-	-	-	+ δ	-
hnRNP A1 + A2	-	-	+ α				
hnRNP AB			-	-	-	+++ δ	
hnRNP AB-2			-	-	-	-	-
hnRNP C-2	++ δ	-	-			-	
hnRNP C-3	-	-	-		++ δ	-	-
hnRNP D-1		++ δ	-	-	-	-	-

hnRNP D-2	++ $\delta$	-	-	-	-	-
hnRNP DL-1		+ $\alpha$				
hnRNP DL-2		+ $\alpha$				
hnRNP F-1	+ $\alpha$	+ $\alpha$	-	-	+ $\delta$	
hnRNP H-1	-	+ $\alpha$	-	++ $\alpha$	+ $\delta$	-
hnRNP F/H	-		-		+ $\delta$	-
hnRNP K-1	-	-	++ $\delta$	-	-	
hnRNP K-2		++ $\alpha$	+ $\delta$		-	-
hnRNP L-2	+ $\alpha$	-	-	+ $\delta$	-	-
hnRNP L-3	-	+ $\alpha$	-	-	-	-
hnRNP M-1	+ $\alpha$	-	-		-	-
hnRNP M-3	-	+ $\alpha$	+++ $\delta$			
hnRNP R-2	-	-	-			
hnRNP R-3			-			
hnRNP R-4				-	-	-
hnRNP R-5				-	-	-
hnRNPU-1	-	-				-
hnRNP U-2	-	-				
hnRNP U-4	-	+ $\delta$	-	-		
HMGA1hit1-1			-	-		-
HMGA1hit1-2			-	-	-	-
HMGA1global1			-	-		
HMGA1global2			-	-		
HRMTIL2-1				-	-	
HRMTIL2-2				-	-	
IMP3-1					++ $\delta$	
IMP3-2					++ $\delta$	
KHRBS1-1					++ $\delta$	
KHRBS1-2					+++ $\delta$	
KHDRBS1-1				-	-	
KHDRBS1-2			+ $\alpha$		-	
KHRSP1						-
KHRSP2						-
KHSRP-1					+ $\alpha$	
KHSRP-2					+ $\alpha$	
NCBP1-1				-		
NCBP1-2				-		
Pippin1						-
Pippin2						-
PRPF8-1			-	-	-	
PRPF8-2			-	-	-	
PTBP1	-	-	-			
PTBP2-5			-	-	-	-
PTBPglobal1						
PTBPglobal2	-	+ $\alpha$	++ $\alpha$			
Raly-1				-	-	
Raly-2				-	-	
RBM3-1			-	-	-	-
RBM4-1			-		-	-

RBM4-2		-		-	-
RBM5-1		-		-	-
RBM5-2		-		-	-
RBM6-1				-	-
RBM6-2				++ $\delta$	-
RBM8A-1		-			
RBM8A-2		-			
RBM8B-1		-		-	-
RBM8B-2		-		-	-
RBM9-1		-	-	-	-
RBM9-2		-	-	-	-
RBM10-1		-	-	+ $\alpha$	
RBM10-2		-	-	+ $\alpha$	
RBM14-1				-	
RBMS1-1			-	-	
RBMS1-2			-	-	-
RBMS2-1		-	-	-	-
RBMS2-2				-	
RBMX-1		-	++ $\delta$		
RBMX-2	++ $\delta$	-	+ $\alpha$		
RNPS1-1			-	-	-
RNPS1-2			-	-	-
RNPC2-1		-	-	-	
RNPC2-2		-	-	-	-
RNPR-5			+ $\alpha$		
SF3A1-1		-	-	-	-
SF3A1-2		-	-	-	
SF3A2-1		-	-		-
SF3A2-2			-		-
SFPQ1			-	-	
SFPQ2			-		
SFRS1-3		-			+++ $\delta$
SFRS2-1		-	-	-	-
SFRS2-2		-	-	-	-
SFRS3-1				-	
SFRS3-2					-
SFRS3-3				-	-
SFRS4-1			-		
SFRS4-2			-		
SFRS5-1			-		-
SFRS5-2			-	-	-
SFRS6-1			-	-	-
SFRS6-2		-		-	-
SFRS9-1			-	-	
SFRS9-2			-	-	++ $\delta$
SFRS10-1			-	-	-
SFRS10-2			-	-	-
SFRS11-1		-			-
SFRS11-2		-			-

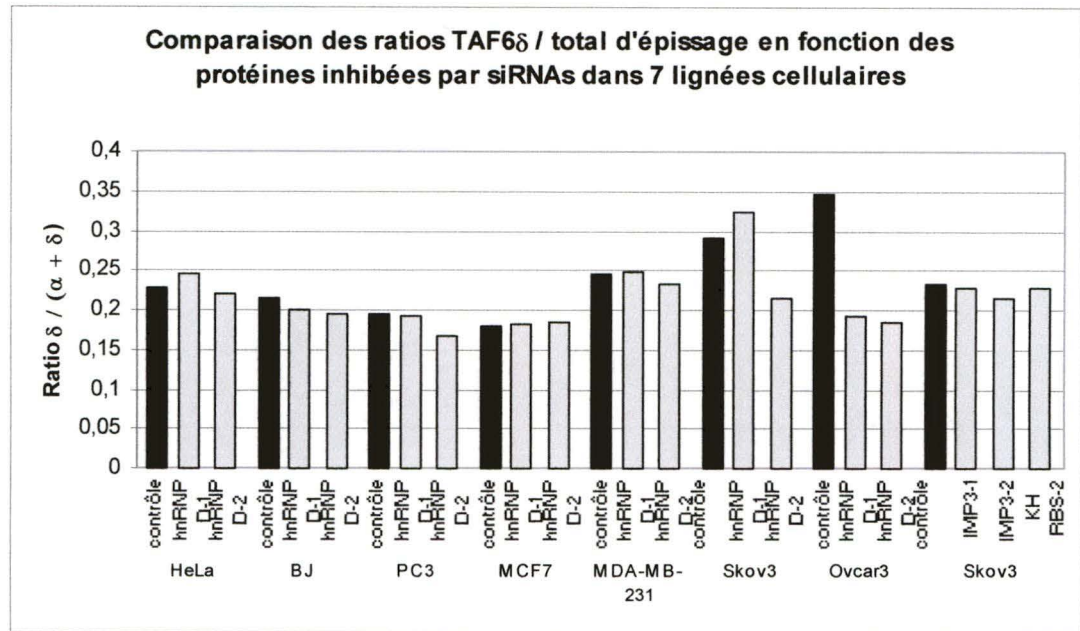


SFRS12-2	-	-	+++ $\delta$	-	+++ $\delta$
SFRS14-1		-		-	
SFRS14-2		-			-
SNRP70-1	-	-	-	-	-
SNRP70-2	-	-	-	-	-
SNW1-1		-	-		
SNW1-2		-	-		
SRPK1-1		-	-		
SRPK1-2		-			
Syncrip1	+++ $\alpha$	-	-	-	-
Syncrip3	++ $\delta$	+ $\alpha$	-	-	-
TIAL1-1		-	-	-	
TIAL1-2		-	-	-	-
U2AF2-1		-	-	-	-
U2AF2-2		-	-	-	-
UBTF-1		-	-	-	
UBTF-2			-	-	

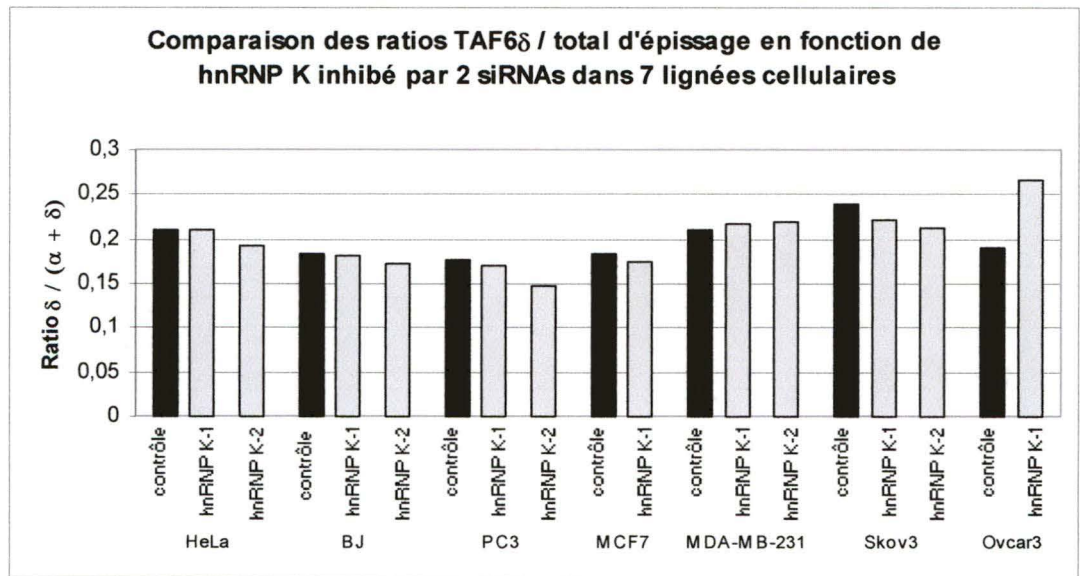
Ces résultats sont qualitatifs. (-) représente une absence de changement visible de l'épissage alternatif de TAF6, (+) représente un faible changement vers TAF6 $\alpha$  ( $\alpha$ ) ou TAF6 $\delta$  ( $\delta$ ), (++) un moyen changement et (+++) un fort changement visible de l'épissage alternatif. Les cases vides signifient qu'il n'y a aucun échantillon disponible de ce siRNA dans une lignée cellulaire donnée.

**Annexe 4.**

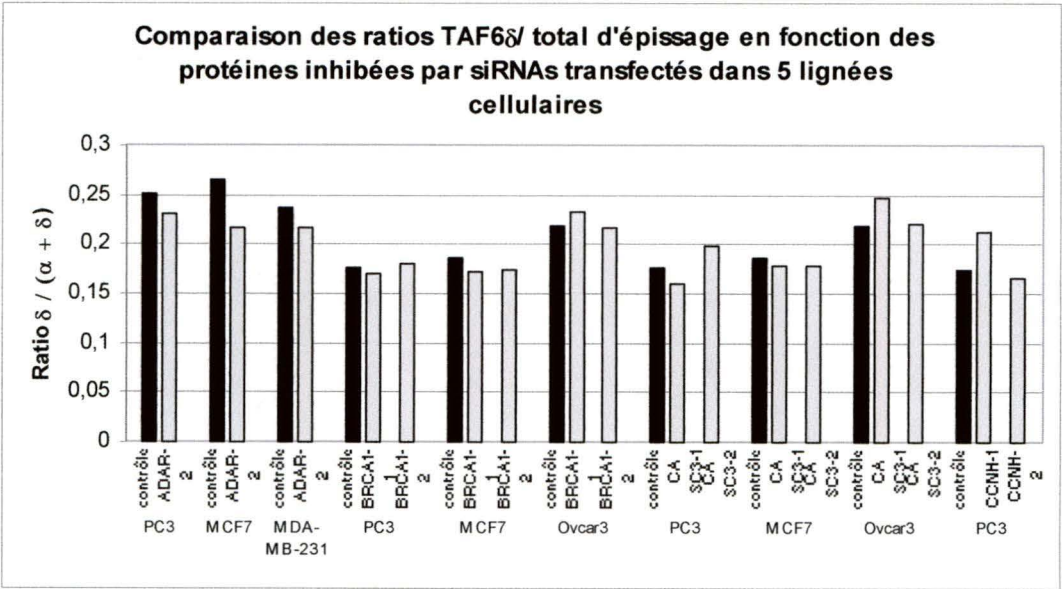
Graphique 1.



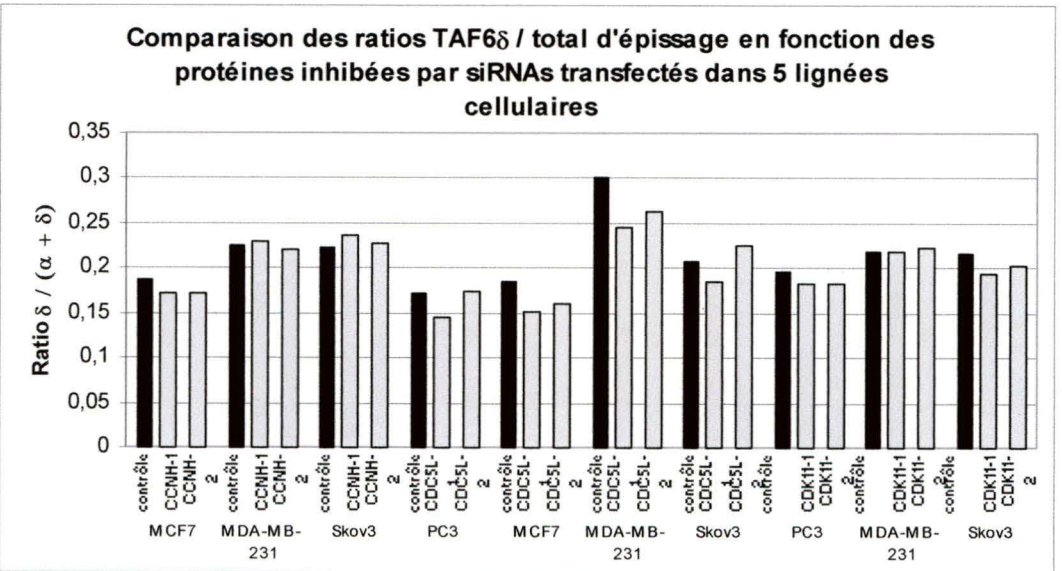
Graphique 2.



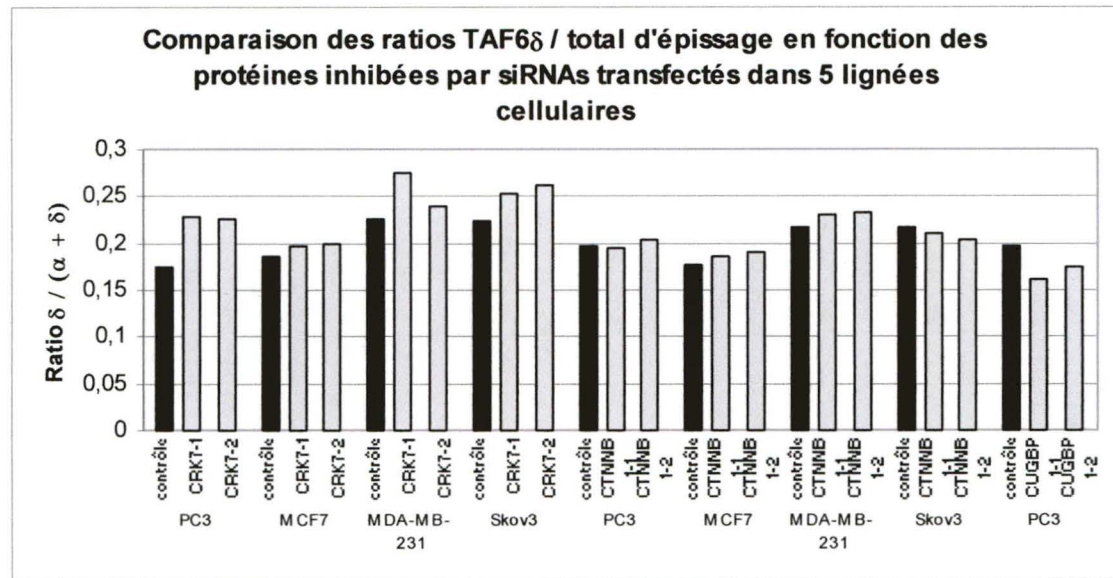
Graphique 3.



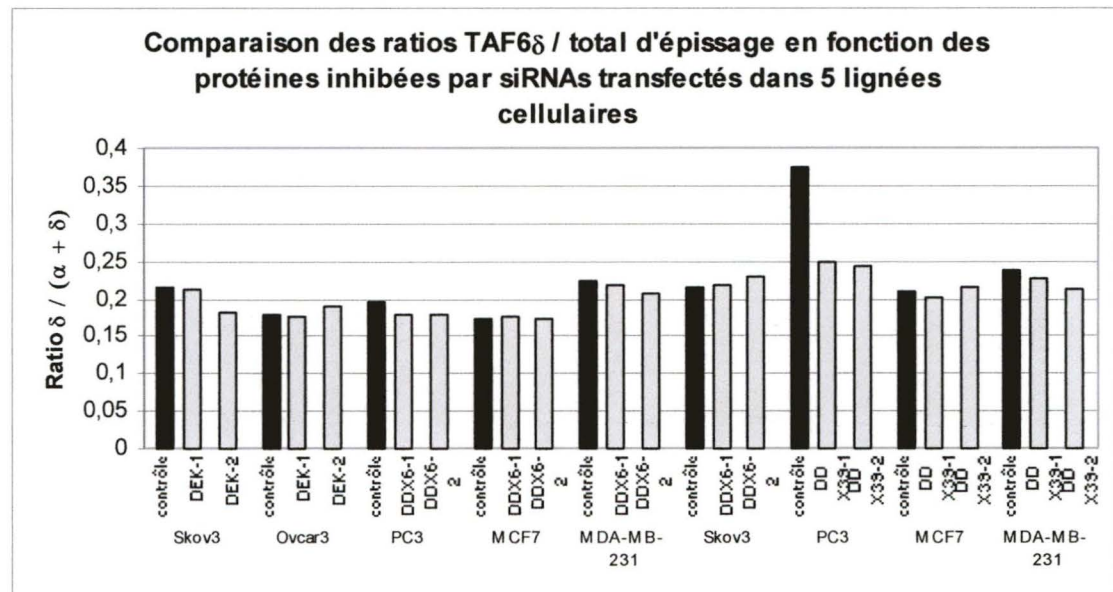
Graphique 4.



Graphique 5.

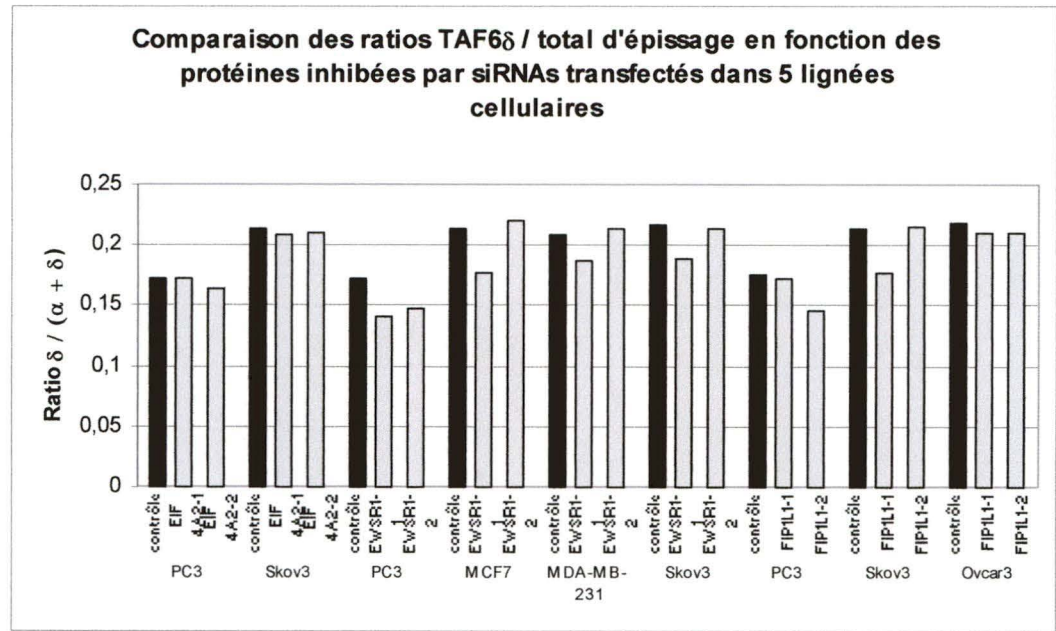


Graphique 6.

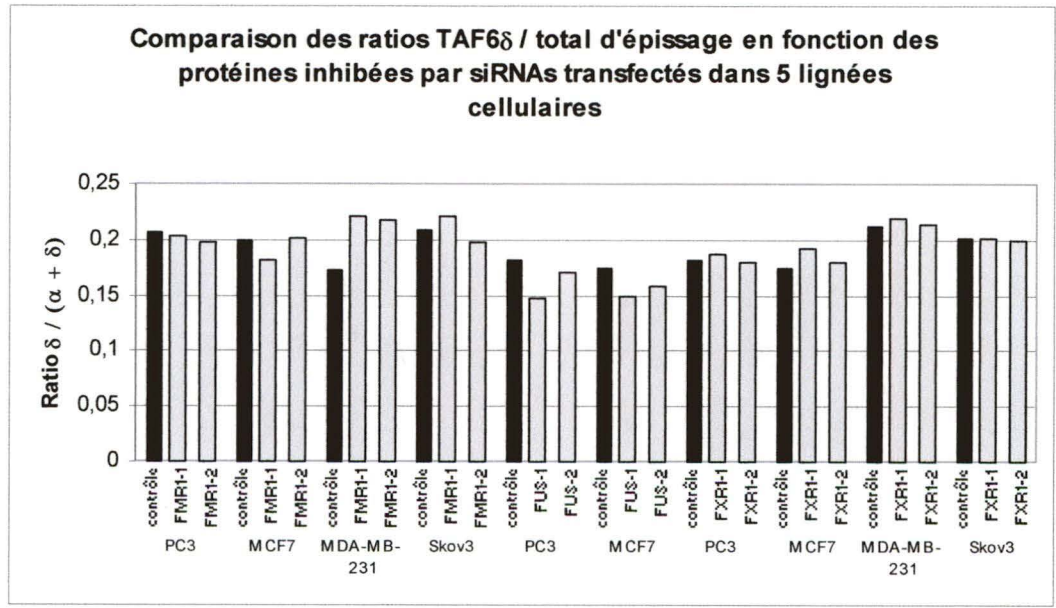




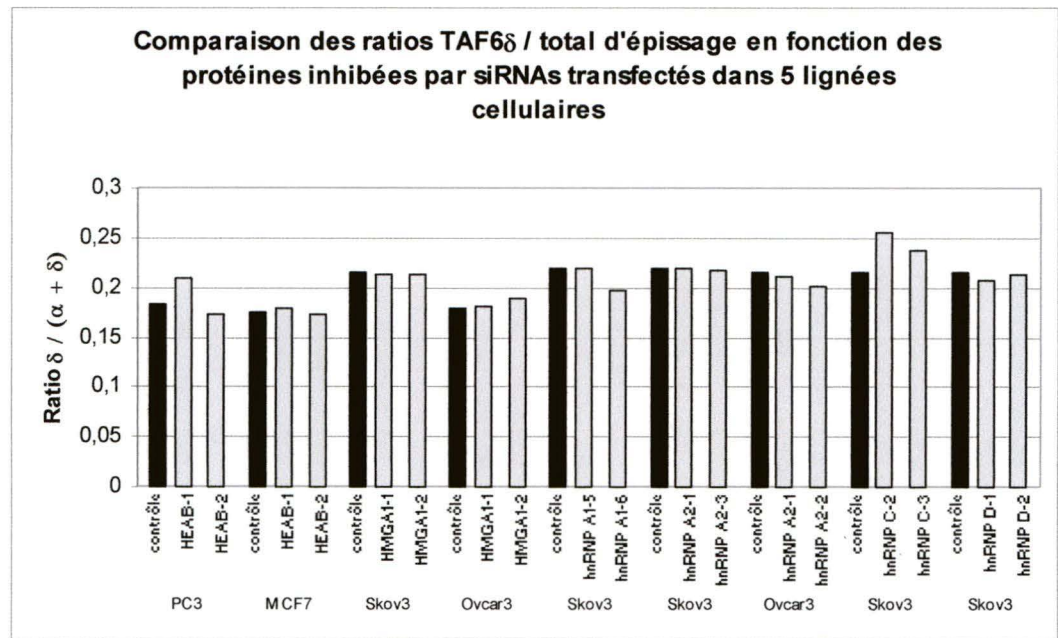
Graphique 7.



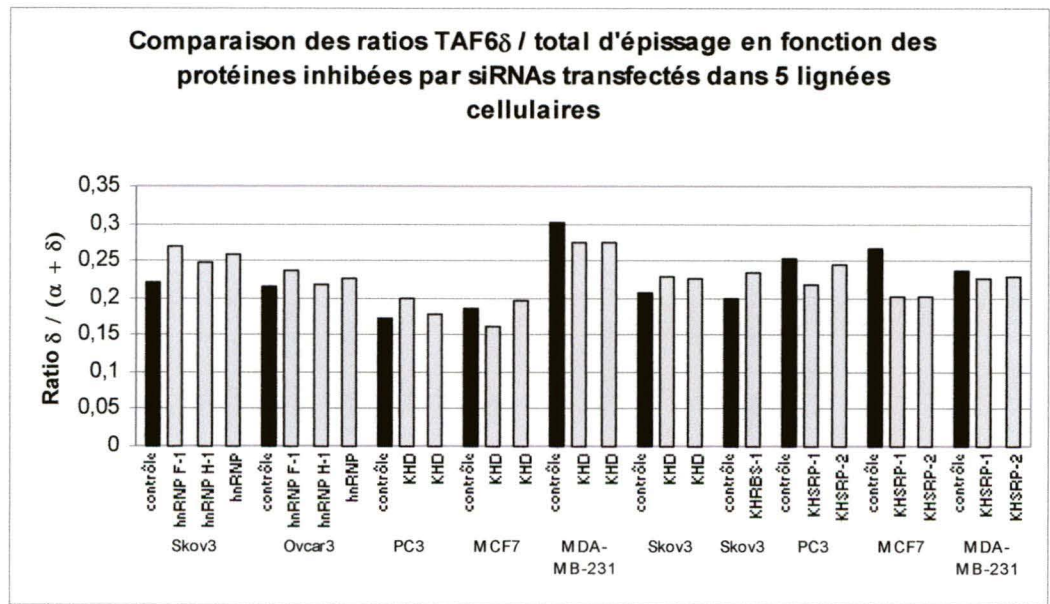
Graphique 8.



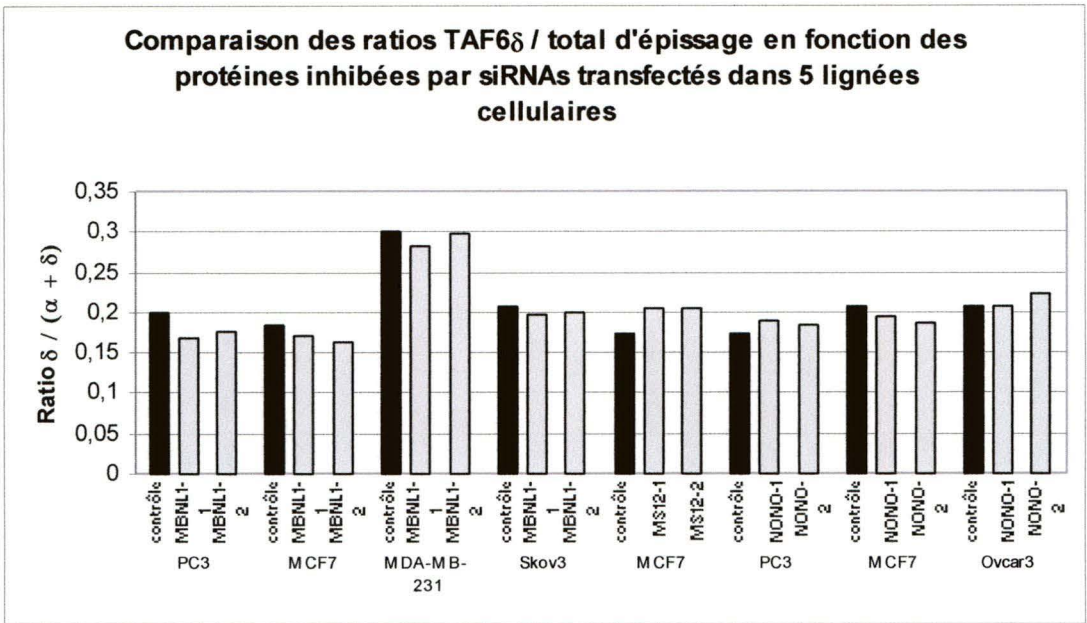
Graphique 9.



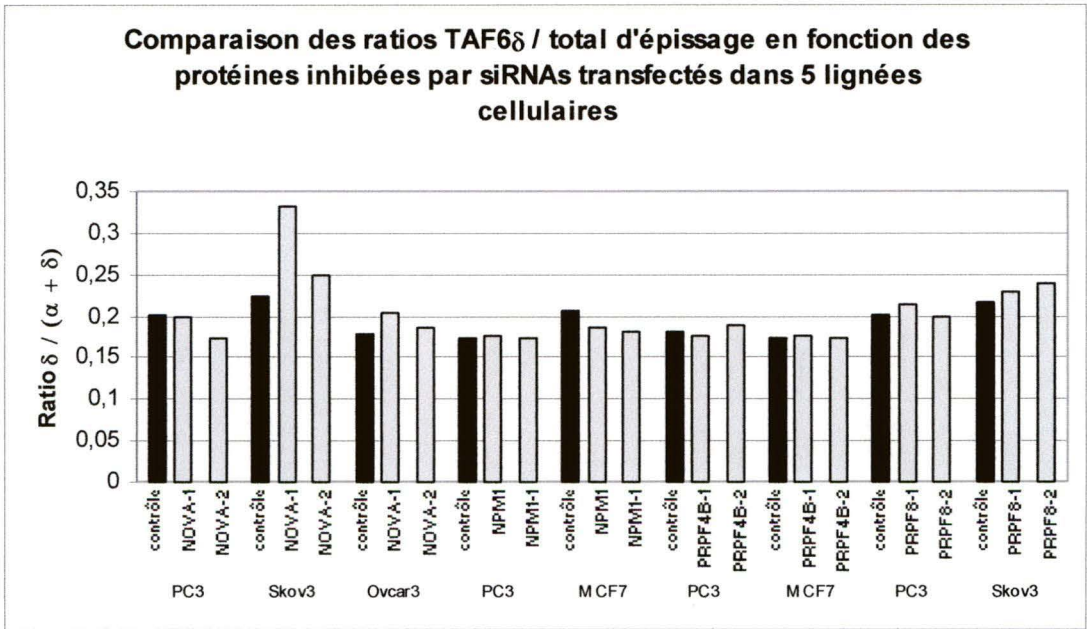
Graphique 10.



Graphique 11.

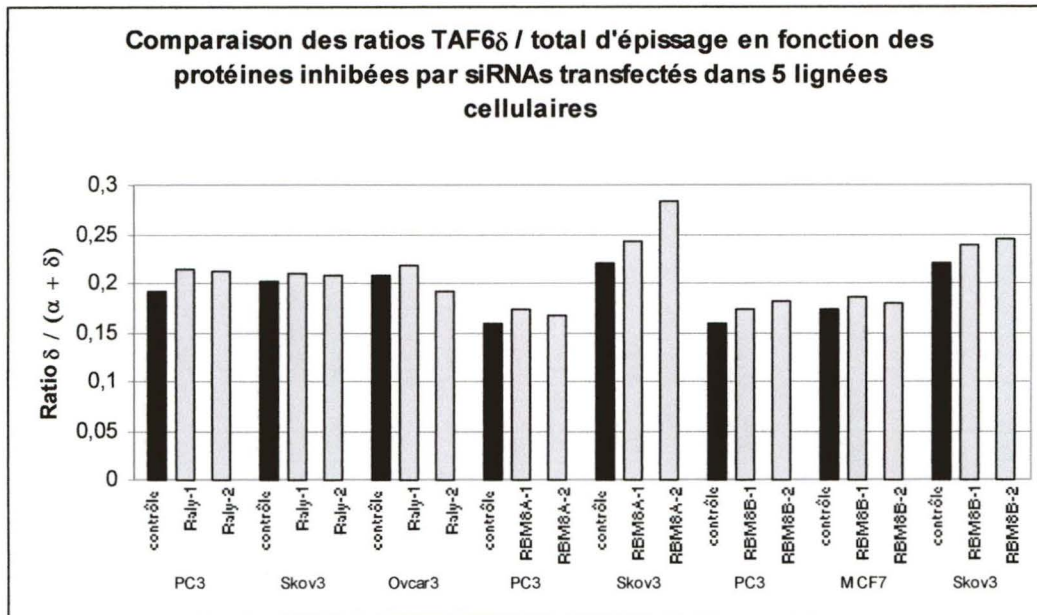


Graphique 12.

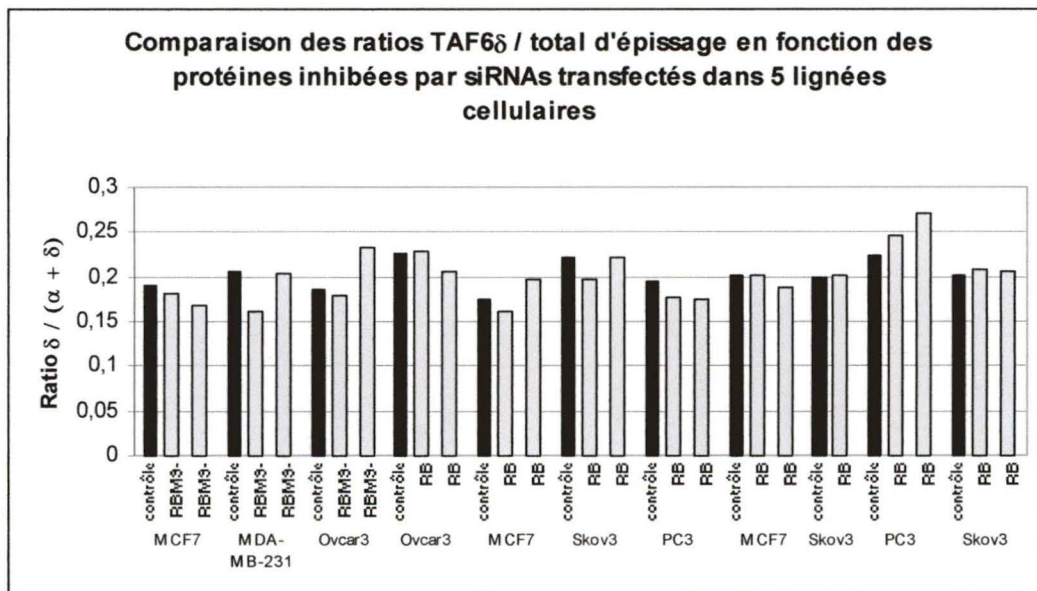




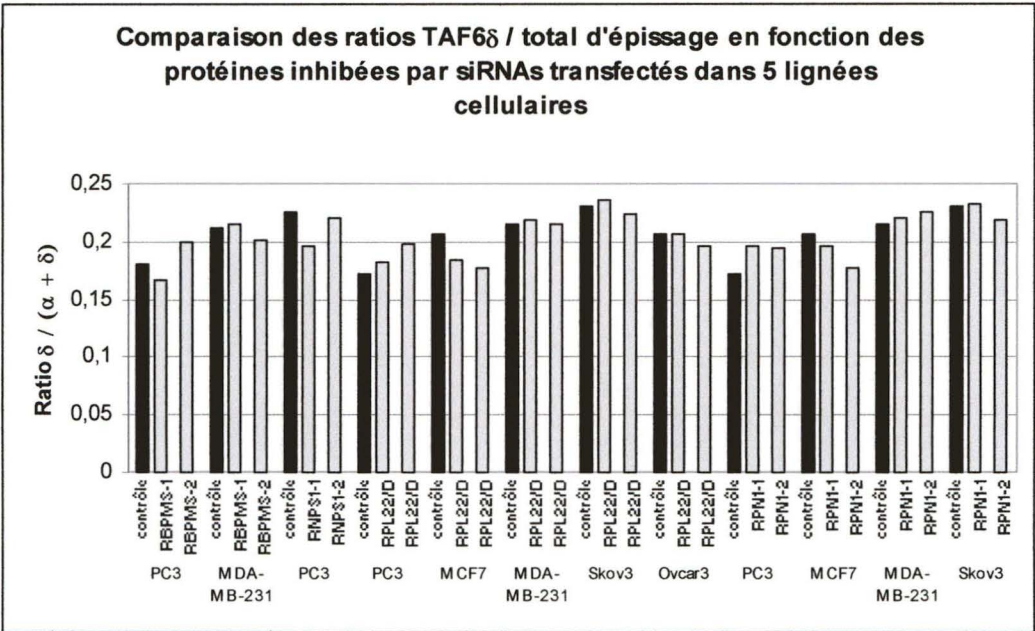
Graphique 13.



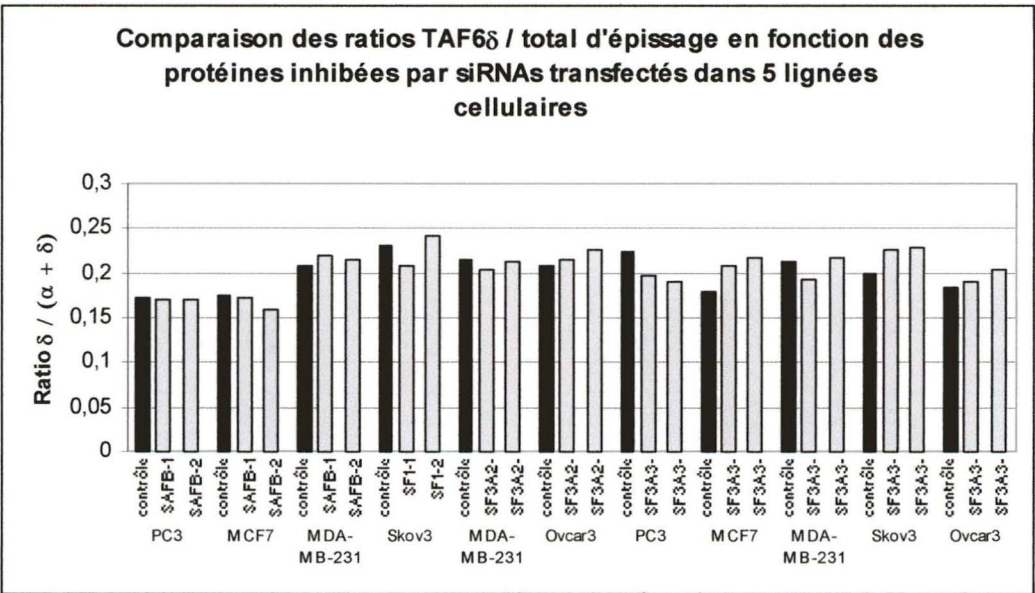
Graphique 14.



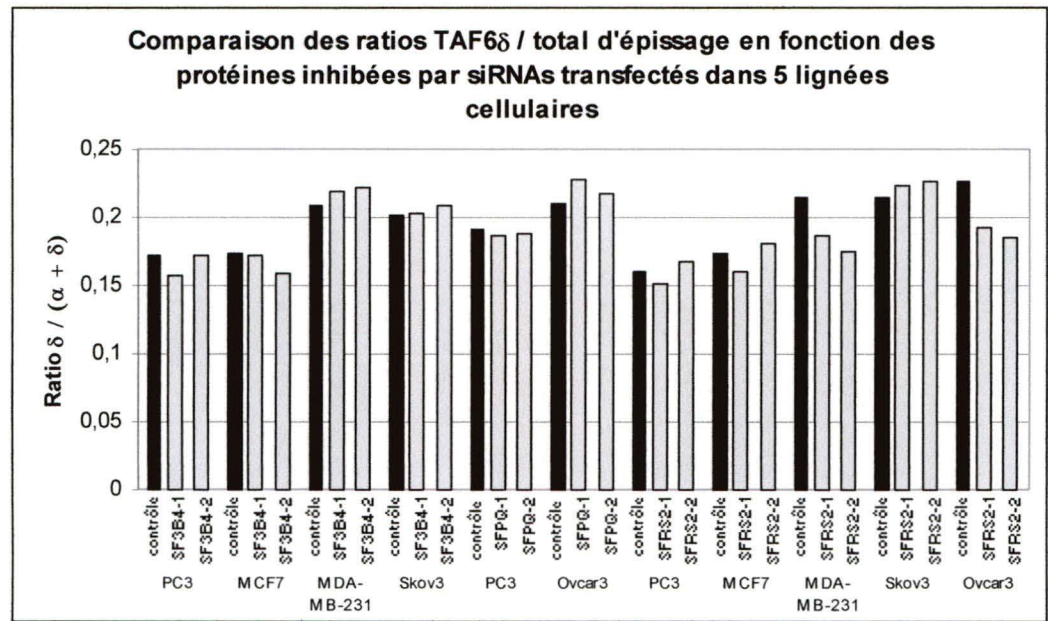
Graphique 15.



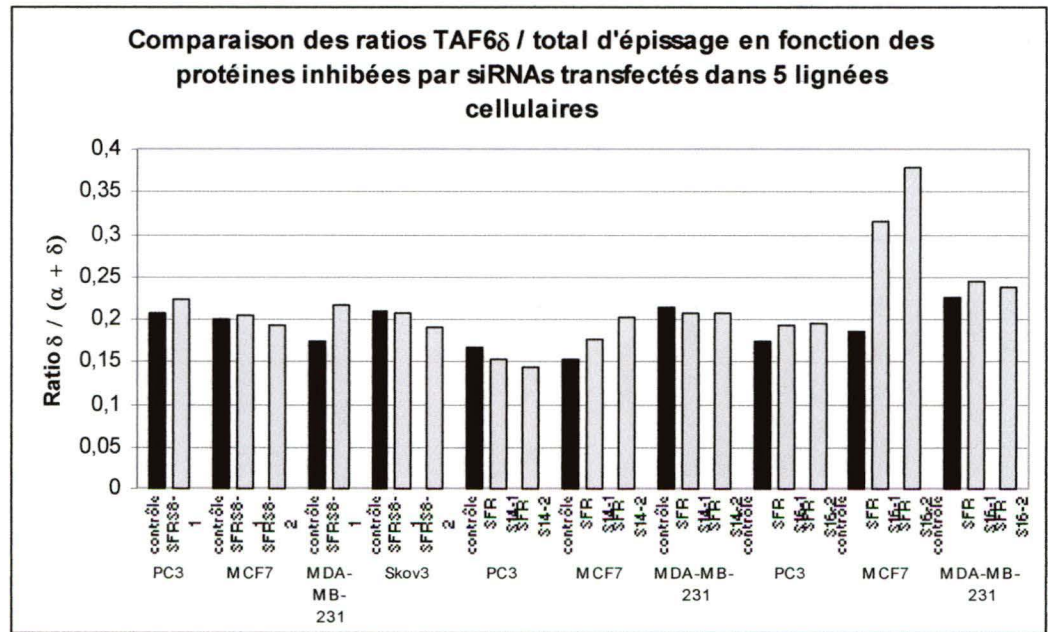
Graphique 16.



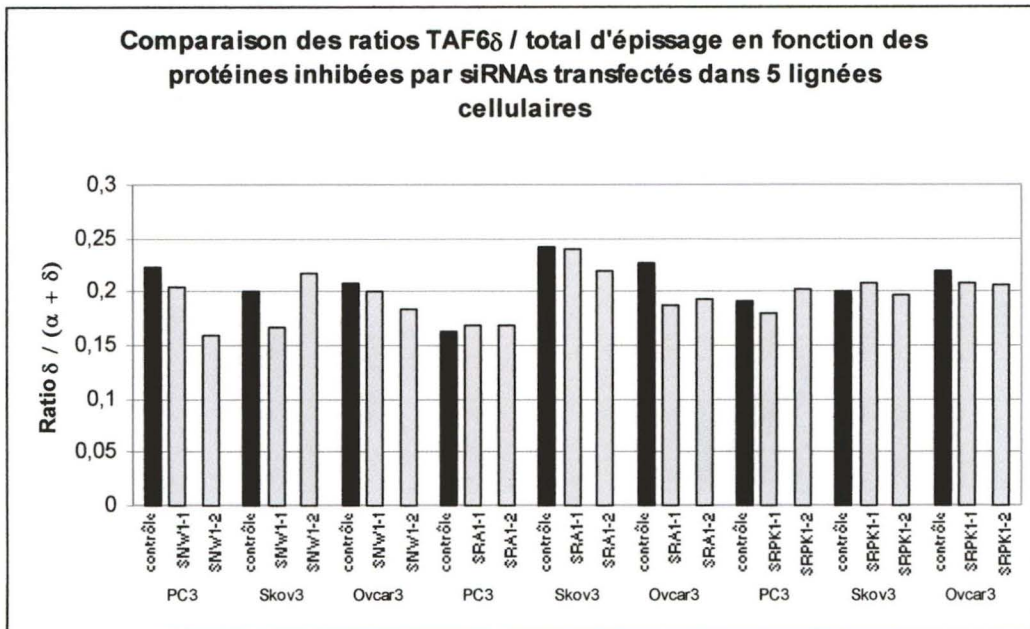
Graphique 17.



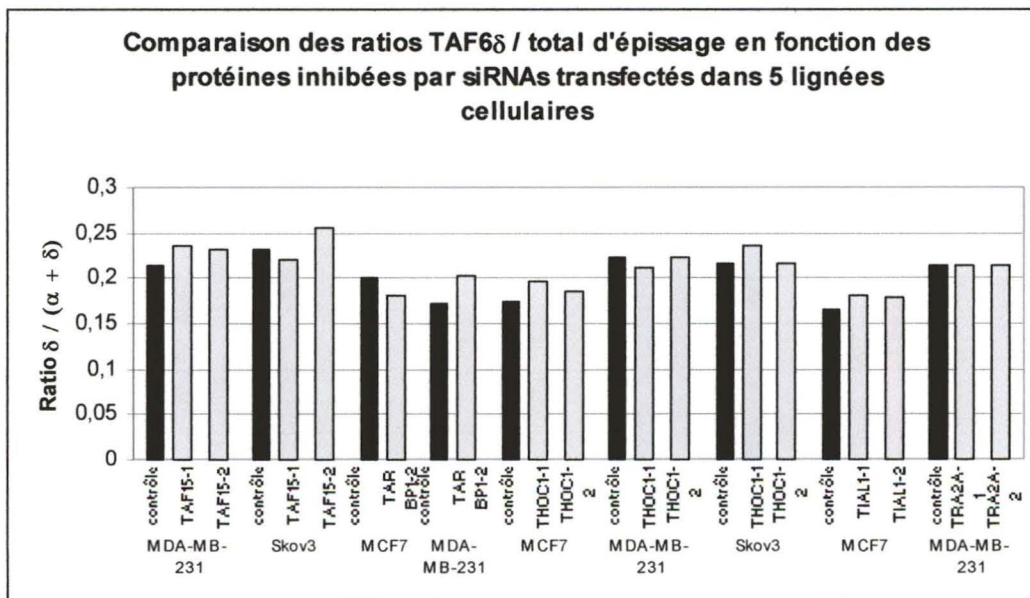
Graphique 18.



Graphique 19.



Graphique 20.





Graphique 21.

